

• 临床检验研究论著 •

类风湿关节炎患者 Th1、Th17 和 Treg 细胞的检测及临床意义

王 波¹, 李 志^{1△}, 杨婷婷², 徐维家¹

(1. 大连市中心医院检验科, 辽宁大连 116033; 2. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁大连 116029)

摘 要:目的 研究类风湿关节炎(RA)患者外周血中 Th1、Th17 与调节性 T 细胞(Treg 细胞)的表达情况并与病情活动性进行相关性分析,探讨 Th17、Th1 与 Treg 细胞在 RA 的发病机制中作用及其临床意义。**方法** 选择 40 例 RA 患者,根据疾病活动性评分(DAS28)评分进行分组;采用流式细胞术检测 RA 患者和 20 例健康对照者外周血中 Th17、Th1 及 Treg 细胞的比例;并分析各细胞与 DAS28 的相关性。**结果** RA 患者 PBMCs 中 Th17 细胞比例高于对照组($P<0.05$),且 RA 活动组 Th17 细胞的比例高于稳定组($P<0.05$);RA 患者 Treg 细胞显著低于对照组($P<0.05$);RA 组和健康对照组 Th1 细胞水平无显著差异($P>0.05$);Th17 细胞数与 RA 疾病活动指标呈正相关。**结论** Th1、Th17 和 Treg 细胞在 RA 患者外周血中有不同的表达,提示 Th17、Th1 及 Treg 细胞在 RA 发病过程中发挥不同的作用。

关键词:关节炎,类风湿;淋巴细胞亚群;生物学标记

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.24.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)24-2978-02

The clinical significance of Th1, Th17 and Treg cells in patients with rheumatoid arthritis

Wang Bo¹, Li Zhi^{1△}, Yang Tingting², Xu Weijia¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Dalian Municipal Central Hospital, Dalian, Liaoning 116033, China;

2. Life Science College of Liaoning Normal University, Dalian, Liaoning 116029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of Th17, Th1 and Treg in peripheral blood in patients with Rheumatoid arthritis(RA)and with disease activity the correlation analysis, and to discuss the role of Th17, Th1 and Treg cells in the pathogenesis of RA. **Methods** Forty patients with RA were recruited, grouping according to RA disease activity score (DAS28). Flow cytometric assay were used to analyse the percentages of Th17, Th1 and Treg cells in 40 cases of RA patients and 20 normal controls, and with disease activity correlation analysis. **Results** The percent of Th17 cells in patients with RA was significantly higher than that of normal controls($P<0.05$), Th17 cells in the active RA group was higher than that of inactive group($P<0.05$); The percent of Treg cells in patients with RA was significantly lower than that of normal controls($P<0.05$); the levels of Th1 cells in RA patients and controls had no difference($P>0.05$); The proportion of Th17 positively correlated with DAS28. **Conclusion** Th1, Th17 and Treg cells in peripheral blood of RA patients, suggest Th17, Th1 and Treg cells play different role in RA pathogenesis process.

Key words: arthritis, rheumatoid; lymphocyte subsets; biological markers

类风湿性关节炎(RA),是 1 种病因尚未明了的慢性全身性炎症性疾病。近年来随着对 T 淋巴细胞亚群的深入研究,发现辅助性 T 细胞 17(Th17)和调节性 T 细胞(Treg 细胞)也可能参与 RA 的病理过程^[1]。本研究采用流式细胞术(FCM)检测 RA 患者外周血中 Th1、Th17 和 Treg 细胞的表达,并探讨其在 RA 发生发展中的意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集大连市中心医院 2011 年 12 月至 2012 年 6 月 RA 患者 40 例,其中男 8 例,女 32 例,年龄 31~65 岁,平均(46.53±10.38)岁;RA 的诊断符合美国风湿病学会 1987 年制定的 RA 分类诊断标准^[2],病程 1 个月至 12 年,平均病程(7.72±3.09)年,并按照疾病活动性评分(DAS28)来评估疾病活动性^[3],定义 DAS28≥3.2 为 RA 活动组(22 例),<3.2 为 RA 稳定组(18 例)。20 例健康体检者作为对照组(男 4 例,女 16 例),年龄 29~58 岁,平均(43.22±10.34)岁。

1.2 仪器与试剂 固定破膜剂 IntraPrepTM、异硫氰酸荧光素(FITC)标记-抗人 CD3 抗体, FITC 标记-抗人 CD4 抗体,藻

红蛋白青色素 5.1(PC5)标记-抗人 CD4 抗体, PC5 标记-抗人 CD25 抗体购自美国 Beckman 公司,藻红蛋白(PE)标记-抗人 IL-17 抗体, PE 标记-抗人 IFN-γ 抗体, PE 标记-抗人 FoxP3 抗体及同型购自美国 eBioscience 公司,佛波酯、离子霉素、莫能霉素购自美国 Sigma 公司,流式细胞仪 Epics-xl 型(Beckman coulter),瑞典 SUNRISE 酶标仪。

1.3 标本采集和处理 受检者均于入院后第 2 天清晨空腹静脉采血 5~6 mL 于肝素抗凝管中,密度梯度离心法分离 PBMCs 用于 Th17 和 Th1 细胞的流式检测,1 mL 外周血直接用于 Treg 细胞的检测。所有标本均无乳糜、无溶血。

1.4 实验方法

1.4.1 Th1 和 Th17 细胞的染色 细胞胞外染色:将 CD3-FITC 和 CD4-PC5 单抗加入到分离出的 PBMCs 中,混匀,避光室温孵育 20 min,用于检测 Th1 和 Th17 细胞;将孵育后的 PBMCs 加入到 RPMI-1640 培养体系中(含 10%新生牛血清、50 ng/mL 佛波酯、1 μg/mL 离子霉素、3 μmol 莫能霉素)稀释细胞终浓度至 1×10^6 /mL, 37 ℃ 培养箱中孵育 18 h。细胞固

△ 通讯作者, E-mail: postlizhi@126.com。

定破膜及胞外染色;用 PBS 洗涤培养后的细胞,固定破膜剂进行固定、破膜之后加入 PE-抗人 IFN- γ 和 PE-抗人 IL-17,对照管加入同型对照抗体,孵育 30 min。

1.4.2 Treg 细胞的染色 取外周血 200 μ L 加入 CD4-FITC 和 CD25-PC5 单抗,混匀,避光室温孵育 20 min;加入溶血素溶解红细胞后,PBS 洗涤 2 次。细胞固定破膜及胞外染色:将 PBS 洗涤后的细胞用固定破膜剂进行固定、破膜加入 PE-抗人 FoxP3 单抗,对照管加入同型对照抗体,孵育 30 min。

1.4.3 流式细胞仪检测 Th1、Th17 和 Treg 细胞 应用 Epi-ics-xl 型流式细胞仪测定淋巴细胞内和胞膜各种荧光素的荧光强度,Th1 (CD3⁺、CD4⁺、IFN- γ ⁺)、Th17 (CD3⁺、CD4⁺、IL-17⁺) 和 Treg 细胞(CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关性分析采用 Pearson 直线相关分析。

2 结 果

2.1 各组外周血中 Th17、Th1 及 Treg 细胞的表达 RA 患者外周血中 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例显著高于对照组 ($P < 0.05$),且 RA 活动组 Th17 细胞的比例高于稳定组 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组外周血中 Th17、Th1 及 Treg 细胞的表达 (%)				
组别	<i>n</i>	Th17/CD4 ⁺ T 细胞	Th1/CD4 ⁺ T 细胞	Treg/CD4 ⁺ T 细胞
RA 稳定组	18	1.64 \pm 0.38*	15.50 \pm 8.42	3.97 \pm 0.39*
RA 活动组	22	1.95 \pm 0.59* Δ	16.28 \pm 9.07	3.36 \pm 0.25*
对照组	20	0.38 \pm 0.19	14.77 \pm 4.85	5.91 \pm 1.54

*:与对照组比较, $P < 0.05$; Δ :与 RA 稳定组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组外周血中 Th17、Th1 及 Treg 细胞与病情活动指数的相关性分析 RA 患者外周血中 Th17 细胞数与病情活动指标 DAS28 呈正相关($r = 0.637, P < 0.05$),Treg 与 Th1 细胞数与病情活动指标无相关性。

3 讨 论

RA 属于自身免疫炎性疾病,大量资料证明了 T 淋巴细胞亚群参与了 RA 免疫应答的诱导和发病,T 淋巴细胞的活化及其产生的细胞因子是引起免疫损伤的主要原因。Th1 细胞曾经被认为是 RA 的主要致病细胞,其分泌的主要产物为 IFN- γ 、IL-2 和 TNF- α 、IFN- γ 能激活单核巨噬细胞增强杀伤力,能诱导和增加主要组织相容复合体 I、II 类抗原的表达,刺激并增强 RA 的炎症反应^[4]。TNF- α 是 RA 主要的致病因子,能诱导促炎的化学因子和黏附分子的表达,导致局部的炎症^[5]。本实验中 RA 患者外周血中 Th1 细胞与对照组比较, $P < 0.05$,与 Zhang 等^[5]的研究结果一致。然而外周血中 Th1 的表达是减少或是不变的结论均有报道,因此还需要深入的研究来证实 Th1 细胞在 RA 中的作用^[6-9]。

Treg 细胞在控制自身免疫反应及维持免疫耐受方面起着关键的作用,Treg 细胞有时需要靠细胞与细胞之间的直接接触来发挥免疫效应^[4],但大多时候是通过分泌细胞因子 TGF- β 来间接实现免疫调节功能。本实验检测了 Treg 细胞在 RA 患者外周血的比率,结果显示活动期和稳定期 RA 组患者 Treg 细胞的比率明显低于对照组 ($P < 0.05$),与国内外多数研究的结果相一致,说明处于 RA 患者 Treg 细胞的免疫能力下降,导

致负调控作用降低,提示 Treg 细胞具有潜在防止 RA 病程的进展及维持疾病稳定性的重要作用,可能是由于 Treg 细胞通过表达化学因子受体而迁移到炎症组织;也可能由于 RA 患者的血清细胞因子环境不利于 Treg 细胞的分化。然而,也有学者报道 RA 患者和健康人外周血中 Treg 细胞含量无差异^[10],洪强等^[11]论述过出现不同结果的原因:由于研究对象不同或与实验条件和选用的试剂盒及流式细胞仪的灵敏度有关。

已经证实 Th17 及其细胞因子在 RA 的发病机制中发挥重要的作用,本实验中分析了 RA 患者外周血中 Th17 细胞的表达,结果显示 RA 患者的 Th17 表达高于对照组 ($P < 0.05$),RA 活动组的 Th17 表达高于 RA 稳定组 ($P < 0.05$),充分说明 Th17 细胞及其相关细胞因子在 RA 的发病过程中发挥重要的致病作用。首先,Th17 能够促进滑膜炎的发生,Th17 及 IL-17 可诱导炎症因子如 IL-6 和 TNF- α 以及趋化因子如 MCP-1 等的表达,通过不同机制发挥致炎作用,共同促进滑膜增生及滑膜炎的发生^[12]。其次,Th17 细胞还能增加对软骨的破坏,其细胞因子 IL-17 能刺激 RA 滑膜细胞内降解酶活性,从而促进滑膜、韧带和软骨基质的破坏。另外,以 IL-17 为靶点的 RA 的治疗已经应用于临床,这些研究均表明 Th17 及 IL-17 是促使滑膜炎及骨软骨破坏的主要因素之一。

因此,对 RA 细胞因子的进一步研究以及细胞因子作用网络的深入认识,有助于对 RA 发病机制的认识并为 RA 的临床治疗提供新的手段。

参考文献

[1] 庞爱梅,刘凤霞,凌欣. 类风湿关节炎患者外周血 Th1/Th2 细胞平衡变化的研究[J]. 医学检验与临床,2007,18(4):52-53.

[2] Arnett FC,Edworthy SM,Bloch DA,et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,1988,31(3):315-324.

[3] Prevoo ML,van't Hof MA,Kuper HH,et al. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,1995,38(1):44-48.

[4] 陈俊伟,张少然,闫成兰,等. T 辅助细胞亚型细胞相关因子在类风湿关节炎发病中的作用[J]. 中国药物与临床,2012,12(4):420-423.

[5] Zhang L,Li JM,Liu XG et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis [J]. J Clin Immunol,2011,31(4):606-614.

[6] Dolhain RJ,van der Heiden AN,ter Haar NT,et al. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum,1996,39(12):1961-1969.

[7] Berner B,Akca D,Jung T,et al. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4⁺ and CD8⁺ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry[J]. J Rheumatol,2000,27(5):1128-1135.

[8] Kawashima M,Miossec P. mRNA quantification of T-bet,GA-TA-3,IFN-gamma, and IL-4 shows a defective Th1 immune response in the peripheral blood from rheumatoid arthritis patients: link with disease activity[J]. J Clin Immunol,2005,25(3):209-214.

(下转第 2981 页)

第 7 天,血清 IgG、IgA 水平明显升高($P<0.01$),且持续升高至 15 d;第 21 天血清 IgG、IgA 水平开始下降,30 d 后血清 IgG、IgA 基本恢复正常水平,与健康对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。AMI 患者与健康对照组 IgG、IgA、IgM 检测结果比较见表 1。

表 1 AMI 患者与健康对照组 IgG、IgM、IgA 结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)
健康对照组	50	11.23±1.16	1.58±0.41	1.47±0.29
AMI 组				
6 h 以内	52	10.85±1.22	1.51±0.38	1.42±0.31
72 h	52	11.59±2.01	1.62±0.52	1.47±0.30
7 d	52	14.31±2.07*	3.16±1.21*	1.48±0.35
15 d	52	18.15±2.54*	4.73±1.35*	1.51±0.39
21 d	52	16.32±2.6*	4.49±1.33*	1.47±0.45
30 d	52	10.65±1.24	2.39±0.91	1.45±0.38

*: $P<0.01$,与健康对照组比较。

3 讨 论

AMI 是指在冠状动脉病变的基础上,冠状动脉血供突然减少或中断,使相应心肌引起严重而持久地缺血损伤和坏死,患者的致残率及死亡率很高。目前,AMI 主要依靠临床表现、心电图及心肌酶谱做出诊断和危险评估^[7]。有学者报道^[8],心肌坏死标志物(心肌肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶、肌酸激酶、肌红蛋白)的联合检测,在 AMI 早期诊断,还是明确诊断之后的治疗过程中,都具有重要指导意义。国内有研究证明^[9],急性心肌梗死患者 IgG、IgA、IgM 水平在病后第 1 天明显降低,在病后第 7 天免疫球蛋白,基本恢复正常,第 14 天免疫球蛋白明显高于正常。本组资料显示,AMI 患者在胸痛发作 6 h 以内 IgG、IgA、IgM 水平呈现下降趋势,胸痛发作 72 h 血清 IgG、IgA 水平开始升高,第 7 天 IgG、IgA 值明显高于对照组,且持续升高至 15 d,表明 B 细胞合成 IgG、IgA 能力增强,间接表明 AMI 患者早期 B 细胞合成 IgG、IgA 受抑制,原因可能与高原

地区缺氧环境下人群免疫功能调节失常有关。在研究中发现,随着 AMI 病情发展与转归,血清 IgG、IgA、IgM 水平先下降后升高,第 7 天 IgG、IgA 值明显高于对照组,且持续升高至 15 d,IgM 无明显变化,在临床有效治疗 21 d 时 IgG、IgA 水平开始下降,30 d 后恢复到正常水平,提示 AMI 患者早期免疫功能处于抑制状态,存在体液免疫功能紊乱,且持续时间长。AMI 患者免疫功能变化与病情转归有密切关系,动态观察免疫球蛋白含量变化,可作为 AMI 病情观察的动态指标。调节免疫治疗可能是治疗 AMI 的新途径,值得进一步研究。

参考文献

[1] 赵献明,李浪.急性心肌梗死心肌损伤的免疫学机制研究进展[J].临床荟萃,2007,22(3):221-223.

[2] 高伟,王士雯,赵玉生,等.北京西郊地区急性心肌梗死 1778 例 7 年临床流行病学分析[J].中国临床康复,2003,7(30):4082-4083.

[3] 王志萍.心脏标志物在急性期心肌梗死的临床意义[J].中外医疗,2010,9(26):193-194.

[4] 郭志强.急性心肌梗死治疗中免疫功能变化评价[J].现代中西医结合杂志,2002,11(8):694-695.

[5] Jaffe AS,World Health Organization,European Society of Cardiology,et al.New standard for the diagnosis of acute myocardial infarction[J].Cardiol Rev,2001,9(6):318-322.

[6] 黄旭映,李艳萍,张宝生.急性心肌梗死患者血清中肌钙蛋白、肌红蛋白和肌酸激酶联合检测及临床意义[J].检验医学与临床,2009,6(10):821-822.

[7] 高波,张洪兵,倪晓峰.CTnI、Mb 和 ECG 联合检测在急性心肌梗死早期诊断中的应用研究[J].中国医药论坛,2006,4(7):21-23.

[8] 王明星.心肌蛋白和肌酸激酶同工酶作为心肌梗死标志物价值探讨[J].检验医学与临床,2011,8(17):2116-2117.

[9] 王原平,李相生.急性心肌梗死合并多器官功能障碍综合征患者血清免疫球蛋白、补体和 C-反应蛋白的变化[J].岭南急诊医学杂志,2004,9(3):170-171.

(收稿日期:2012-08-08)

(上接第 2979 页)

[9] Shen H,Goodall JC,Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis[J].Arthritis Rheum,2009,60(6):1647-1656.

[10] Liu MF,Wang CR,Fung LL,et al. The presence of cytokine-suppressive CD4⁺CD25⁺ T cells in the peripheral blood and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis[J].Scand J Immunol,2005,62(3):312-317.

[11] 洪强,宋秀宇,黄家禹,等.CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺调节性 T 细胞在类风湿关节炎及骨关节炎患者外周血和关节液中含量的变化[J].中国生物制品学杂志,2011,24(2):169-172.

[12] 于月红,孙海玲,钱雷.类风湿关节炎患者外周血 Th17 细胞的检测及其临床意义[J].检验医学与临床,2011,8(13):1582-1583.

(收稿日期:2012-01-09)

总体与样本

根据研究目的确定的同质研究对象的全体(集合)称为总体,包括有限总体和无限总体。从总体中随机抽取的部分观察单位称为样本,样本包含的观察单位数量称为样本含量或样本大小。如为了解某地区 10~15 岁儿童血钙水平,随机选取该地区 3 000 名 10~15 岁儿童并进行血钙检测,则总体为该地区所有 10~15 岁儿童的血钙检测值,样本为所选取 3 000 名儿童的血钙检测值,样本含量为 3 000 例。类似的研究需满足随机抽样原则,即需要采用随机的抽样方法,保证总体中每个个体被选取的机会相同。