

• 临床检验研究论著 •

系统性红斑狼疮患者外周血 CD3⁺CD56⁺自然杀伤 T 细胞的表达及临床意义^{*}

邹原方¹, 罗婉莹², 郭少卿¹, 关晓东¹, 梁翔¹

(中山大学附属东华医院: 1. 肾内风湿科; 2 内分泌科, 广东东莞 523220)

摘要:目的 研究系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 CD3⁺CD56⁺自然杀伤 T 细胞(NKT)的表达,探讨其临床意义。方法 用流式细胞仪检测 60 例 SLE 患者及 30 例健康体检者(对照组)外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平,评估 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达与 SLE 活动指数(SLEDAI)和实验室指标的相关性。结果 SLE 患者 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平[(2.03±0.21)%]明显低于对照组[(4.28±0.32)%],差异有统计学意义($P<0.05$);SLE 组 IL-4 水平为(41.82±10.41)pg/mL,明显高于对照组[(16.89±7.63)pg/mL],差异有统计学意义($P<0.05$);CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平与 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量、抗双链 DNA 抗体(抗 ds-DNA 抗体)及白细胞介素 4(IL-4)水平呈负相关($r=-0.601, P<0.05$; $r=-0.584, P<0.05$; $r=-0.661, P<0.05$; $r=-0.528, P<0.05$);与补体 C3 呈正相关($r=0.613, P<0.05$)。结论 SLE 患者体内存在 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞数量下降和功能缺陷,可能与 SLE 的发病有关。

关键词: 系统性红斑狼疮; 自然杀伤 T 细胞; 相关性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)08-0967-02

The expression and clinical significance of on CD3⁺CD56⁺NKT cells in patients with systemic lupus erythematosus^{*}

Zou Yuanfang¹, Luo Wanying², Guo Shaoqing¹, Guan Xiaodong¹, Liang Xiang¹

(1. Department of Nephrology Rheumatology; 2. Department of Endocrinology, the Affiliated Donghua Hospital of Sun Yet-Sen University, Dongguan, Guangdong 523220, China)

Abstract: **Objective** To investigate the alteration of CD3⁺CD56⁺NKT cells number in patients with systemic lupus erythematosus(SLE) and to analyze the relationship between CD3⁺CD56⁺NKT and disease activity. **Methods** Blood samples were obtained from 60 patients with SLE and 30 healthy control subjects(control group). The level of CD3⁺CD56⁺NKT cells was detect by flow cytometry. The relationships between the level of CD3⁺CD56⁺NKT cells and some laboratory parameters were analyzed. **Results** The level of CD3⁺CD56⁺NKT in control group was(4.28±0.32)%, and (2.03±0.21)% in SLE patients, the difference was statistically significant($P<0.05$). The level of IL-4 in SLE patients was(41.82±10.41)pg/mL, which was significantly higher than that in control group[(16.89±7.63)pg/mL, $P<0.05$]. Negative correlation was found between the level of CD3⁺CD56⁺NKT cells and SLEDAI, proteinuria, IL-4 as well as anti-dsDNA. However, positive correlation was found between the number of CD3⁺CD56⁺NKT cells and level of C3. **Conclusion** The number of CD3⁺CD56⁺NKT cells in SLE patients decreases significantly and has close relationship with disease activity.

Key words: systemic lupus erythematosus; natural killer T cell; correlation

系统性红斑狼疮(SLE)是一种弥漫性结缔组织病,发病机制复杂,迄今为止,其发病机制仍未完全明确,但免疫调节异常可能是其中最为关键的因素之一。CD3⁺CD56⁺自然杀伤 T 细胞(NKT)是近年新发现的一种免疫调节细胞,在机体的免疫自稳、抗感染和抗肿瘤及移植免疫等方面起重要作用^[1-2]。最近有研究发现 NKT 细胞功能异常与某些实验动物自身免疫性疾病,尤其是 SLE 的发病有密切关系^[3]。但在 SLE 患者体内 NKT 细胞是否存在同样的状况,目前国内外的研究仍较少。本研究采用流式细胞仪的方法,检测 SLE 患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞的表达,旨在明确 SLE 患者体内是否存在 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞数量表达异常和功能缺陷。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2012 年 1 月至 2013 年 6 月在本院肾内风湿科明确诊断的 60 例 SLE 患者为研究对象,同期选取性别和年龄均匹配的健康体检者 30 例为对照组。入选标准:符合美国风湿病学会 1997 年修订的 SLE 分类标准。排除标准:无合并肿瘤、感染、严重肝肾功能不全及其他自身免疫性疾病。采

用 SLE 活动指数(SLEDAI)计分法对患者进行病情活动评估。

1.2 研究设计 采用临床横断面调查的策略入选研究对象,详细记录所有患者的 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量、抗双链 DNA 抗体(抗 ds-DNA 抗体)、补体 C3、CD3⁺CD56⁺NKT 细胞数量、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素 4(IL-4)等。然后比较 SLE 患者与对照组外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平有无差异,分析 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平与 SLE 病情活动性及各实验室指标的相关性。

1.3 仪器与试剂 采用贝克曼公司提供的单克隆抗体 CD45-FITC、CD3-PC5、CD56-PE,以及红细胞(RBC)裂解液。检测仪器为贝克曼库尔特 FC500MCL 流式细胞仪。试剂盒购于晶美生物工程有限公司。

1.4 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞及 IFN- γ 、IL-4 检测 在同一流式专用试管中,加入上述单克隆抗体(CD45-FITC、CD3-PC5、CD56-PE)各 5 μ L,同时加入 EDTA 抗凝全血 50 μ L;混匀,避光孵育 20 min;加入 RBC 裂解液 500 μ L 裂解 20 min;加入 PBS 500 μ L,上机检测。用 CD45/SS 设门圈定淋巴细胞群,在

^{*} 基金项目:东莞市科技计划医疗卫生类科研一般项目(201210515046249)。 作者简介:邹原方,男,主治医师,主要从事系统性红斑狼疮的诊治研究工作。

十字门图中分析 CD3⁺与 CD56⁺双阳性区域细胞百分比,即为 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞百分比。IFN- γ 、IL-4 的测定采用酶联免疫吸附试验(ELISA),严格按照试剂盒操作说明进行。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。正态分布的连续变量采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料用率表示;计量资料两组间比较采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,非正态分布比较采用秩和检验;采用 Pearson 相关分析方法,分析 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平与 SLEDAI 评分及实验室指标的关联性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SLE 患者基本资料 共 60 例 SLE 患者符合纳入标准,活动期患者 36 例(60%),稳定期患者 24 例(40%);病程 12 周至 6 年;年龄 16~52 岁,平均 (28.7 ± 10.4) 岁;男性 5 例(8.3%),女性 55 例(91.7%);SLEDAI 评分 2~26 分,平均 (9.2 ± 4.5) 分。对照组 30 例,均为女性。两组在年龄、性别构成上比较差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

2.2 两组患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达 60 例 SLE 患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞平均表达水平为 $(2.03 \pm 0.21)\%$,30 例对照组平均表达水平为 $(4.28 \pm 0.32)\%$,SLE 患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平显著低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 两组患者外周血 IFN- γ 、IL-4 水平 SLE 组 IFN- γ 水平为 (36.34 ± 8.68) pg/mL,与对照组 (35.78 ± 7.45) pg/mL 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);SLE 组 IL-4 水平为 (41.82 ± 10.41) pg/mL,显著高于对照组 $[(16.89 \pm 7.63)$ pg/mL],差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 SLE 患者 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达与实验室指标的相关性分析 在 SLE 患者中,CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平与 SLEDAI 评分、24 h 尿蛋白定量、抗 ds-DNA 抗体及 IL-4 水平呈负相关($r = -0.601, P < 0.05; r = -0.584, P < 0.05; r = -0.661, P < 0.05; r = -0.528, P < 0.05$);与补体 C3 呈正相关($r = 0.613, P < 0.05$);与 IFN- γ 无明显相关性($P > 0.05$)。

3 讨 论

NKT 细胞是一类具有 NK 受体和 T 细胞受体,且显示 NK 细胞和 T 细胞两方面性质的淋巴细胞,近年来备受关注。NKT 细胞的主要特征为:T 细胞受体(TCR)基因表达的恒定性,CD1d 的限制性及细胞因子产生的迅速性、高水平性^[4]。近年来随着对其研究的深入,发现 NKT 细胞与某些实验动物自身免疫性疾病,尤其是 SLE 的发病有着重要关系^[2],因此 NKT 细胞在自身免疫病中的作用越来越受到重视^[5]。本研究结果提示,SLE 患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞平均表达水平显著低于对照组,相关分析进一步发现 SLE 患者 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞表达水平与 SLEDAI 评分、抗 ds-DNA 抗体、24 h 尿蛋白定量呈负相关,与补体 C3 呈正相关。这说明 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞可能与 SLE 的发生发展有关。

初始 CD4⁺T 细胞接受抗原刺激后首先分化为 Th0 细胞,Th0 细胞继续分化为 Th1 或 Th2 不同亚群的细胞。Th1 细胞分泌 IL-2、IFN- γ 和肿瘤坏死因子(TNF),Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-10。Th0 细胞的分化方向取决于抗原的性质和局部环境中的激素及细胞因子等因素,其中细胞因子的类别和细胞因子间的平衡对 Th0 细胞具有重要的调节作用。固有免疫应答中由巨噬细胞产生的 IL-12 是促进向 Th1 细胞分化的重要细胞因子,由 NK 细胞分泌的 IFN- γ 除促进巨噬细胞分泌 IL-12 外,还抑制 Th2 细胞的增殖,进而引起 Th1 的分化和保护

性免疫应答反应^[2,6]。Th2 细胞的分化则依赖 IL-4。虽然 Th0 细胞可分泌一定量的 IL-4,但诱导 Th2 细胞分化所需的 IL-4 主要由 NKT 细胞分泌。当 NKT 优势分泌 IL-4、IL-10、IL-13 时,可引起 Th2 的分化和抑制性免疫反应。NKT 细胞既有增强免疫反应又有抑制免疫反应的双向免疫调节功能。有研究报道,SLE 模型小鼠存在 NKT 细胞的数量减少和功能缺陷^[6];而在 SLE 患者的研究中发现^[8-9],NKT 细胞数量明显减少,但 Th2 型细胞因子却明显升高,促进 Th2 型体液免疫反应。国外的研究同样显示,NKT 细胞在免疫应答链中,可能分泌 IL-4 促进 Th2 样免疫应答^[10],同时也发现 NKT 细胞功能与抗原引起的免疫耐受的形成密切相关^[11-12]。本研究也证实,SLE 患者 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞数量明显比对照组减少,但 IL-4 水平却显著高于对照组,提示 SLE 的发病可能与 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞数量减少及其功能严重失调有关。

当然本研究也存在一定的局限性。首先是单中心、小样本研究,其次为横断面调查,不能确定其因果关系。因此,有待于多中心、大样本、前瞻性的研究来证实本结果。

综上所述,SLE 患者外周血 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞数量显著减少,且与病情活动相关,IL-4 水平显著升高,提示 CD3⁺CD56⁺NKT 细胞可能与 SLE 的发病有关,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] 汪玫,瞿金涛,周琳. iNKT 细胞在系统性红斑狼疮发病机制中的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2010,33(2):85-88.
- [2] 刘景华,于力. NKT 细胞研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24(2):194-196.
- [3] Yang JQ, Chun T, Liu HZ, et al. CD1d deficiency exacerbates inflammatory dermatitis in MRL2 lpr/lpr mice[J]. Eur J Immunol, 2004,34(6):1723-1732.
- [4] 张艳,魏海涛,张元鼎,等. 自然杀伤 T 细胞的研究进展[J]. 生物技术通报,2009,6 增刊:10-14.
- [5] Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, et al. NKT cells: what is in a name[J]. Nat Rev Immunol, 2004,4(3):31-37.
- [6] 黄祺琦,黄先豹,陈国安,等. CD3⁺CD56⁺NKT 样细胞在急性白血病患者体内表达的研究[J]. 实验与检验医学,2010,28(2):120-122.
- [7] GÖd6 M, Sessler T, Hanlar P. Role of invariant natural killer T (iNKT) cells in systemic lupus erythematosus [J]. Curt Med Chem, 2008,5(18):1778-1787.
- [8] 马莉,楚兰,杨洁,等. 系统性红斑狼疮患者 Va24-v β II 自然杀伤 T 细胞致病性的研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(2):181-183.
- [9] 朱静,周彬,张剑波,等. CD3⁺CD56⁺自然杀伤 T 细胞在系统性红斑狼疮中的检测及意义[J]. 中华风湿病学杂志,2010,14(5):320-322.
- [10] Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, et al. Role of NK1.1+T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production[J]. Science, 1995,270(5243):1845-1847.
- [11] Ikehara Y, Yasunami Y, Kodama S, et al. CD4⁺V α 14 natural killers T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice[J]. J Clin Invest, 2000,105(12):1761-1767.
- [12] Seino K, Fukao K, Muramoto K, et al. Requirement for natural killer T(NKT) cells in the induction of allograft tolerance[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001,98(5):2577-2581.