

• 论 著 •

抗核抗体阳性患者外周血淋巴细胞亚群结果分析*

王延娇¹, 马丽菊^{2,3,4}, 何增品^{2,3,4}, 李 娅^{2,3,4}, 何成禄^{2,3,4}, 钟 敏^{2,3,4,△}

(1. 墨江县人民医院检验科, 云南普洱 654800; 2. 昆明医科大学第一附属医院检验科, 昆明 650032; 3. 云南省实验诊断研究所, 云南昆明 650032; 4. 云南省检验医学重点实验室, 云南昆明 650032)

摘要:目的 探讨抗核抗体(ANA)阳性患者外周血淋巴细胞亚群表达水平在自身免疫性疾病(AID)中的临床应用价值。方法 选取 200 例 ANA 阳性患者和 196 例 ANA 阴性患者分别作为试验组和对照组, 其中试验组采用间接免疫荧光试验(IFA)和免疫印迹试验(LIA)检测 ANA, 并根据检测结果分为 IFA 组和 LIA 组, 同时采用流式细胞术检测各组外周血 T 淋巴细胞、辅助性 T 淋巴细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞和 B 淋巴细胞绝对值, 对检测结果进行统计分析。结果 试验组辅助性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞、B 淋巴细胞绝对值明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 试验组内, IIF 组辅助性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞绝对值明显低于 LIA 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 外周血淋巴细胞亚群可以作为 AID 诊疗过程中的重要检测指标。

关键词: 抗核抗体; 淋巴细胞亚群; 流式细胞术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)22-3120-03

Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in patients with antinuclear antibody positive*

WANG Yanjiao¹, MA Liju^{2,3,4}, HE Zengpin^{2,3,4}, LI Ya^{2,3,4}, HE Chenglu^{2,3,4}, ZHONG Min^{2,3,4,△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Mojiang County People's Hospital, Puer, Yunnan 654800, China;

2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Kunming

Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Yunnan Provincial Institute of

Experimental Diagnosis, Kunming, Yunnan 650032, China;

4. Yunnan Provincial Key Laboratory of Laboratory Medicine, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical application value of peripheral blood lymphocyte subsets expression levels in autoimmune disease(AID) among the patients with anti-nuclear antibody(ANA) positive. **Methods** 200 patients with ANA positive and 196 patients with ANA negative were selected as the experimental group and control group respectively. The experimental group adopted indirect immunofluorescence assay(IFA) and immunoblotting assay(LIA) for detecting ANA, moreover divided into the IFA group and LIA group according to the detection results. Meanwhile the flow cytometry was adopted to detect peripheral blood T lymphocytes, helper T lymphocytes, cytotoxic T lymphocyte, NK lymphocytes and B lymphocytes absolute values of each group. The detection results were statistically analyzed. **Results** Helper T lymphocytes, NK lymphocytes and B lymphocytes absolute values in the experimental group were significantly lower than those in the control group, the differences were statistically significant($P < 0.01$); in the experimental group, helper T lymphocytes and NK lymphocytes absolute values in the IIF group were significantly lower than those in the LIA group, the differences were statistically significant($P < 0.01$). **Conclusion** Peripheral blood lymphocytes subsets can serve as the important detection indicators during the diagnosis and treatment process of AID.

Key words: antinuclear antibody; lymphocyte subsets; flow cytometry

抗核抗体(ANA)是自身免疫性疾病(AID)的重要标志物, 不同 AID 都伴有特征性的抗核抗体谱, 患者血液中存在高效价抗核抗体是 AID 的特点之一, 也是临床确诊 AID 的重要依据^[1]。正常情况下, 机体各淋巴细胞亚群保持一定的数量和比例, 相互调节, 维持着正常免疫功能; 当不同淋巴细胞亚群数量及功能发生异常改变时, 机体会产生一系列病理变化和免疫功能失调, 导致疾病的发生。患者淋巴细胞亚群的检测对于早期发现和控制疾病、指导临床治疗、评估机体免疫状态有重要意义。近年来, 外周血淋巴细胞亚群分析已广泛应用于许多疾病如获得性免疫缺陷综合征、AID 等疾病的辅助诊断^[2-3], 其检测结果对于分析发病机制、观察疗效及监测预后有重要的临床意

义。本研究探讨抗核抗体阳性患者外周血淋巴细胞亚群检测在 AID 诊疗中的临床价值, 旨在为临床提供参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 9 月至 2016 年 12 月昆明医科大学第一附属医院的 200 例 ANA 阳性患者和 196 例 ANA 阴性患者分别作为试验组和对照组。试验组男 99 例, 女 101 例, 年龄 10~85 岁, 平均 50 岁; 对照组男 133 例, 女 63 例, 年龄 10~83 岁, 平均 41 岁。

1.2 仪器与试剂 ANA 检测试剂为德国欧蒙抗核抗体 IgG 检测试剂盒, 仪器为日本 Olympus BX51 荧光显微镜和德国欧

* 基金项目: 云南省卫生科技计划项目(2016NS032)。

作者简介: 王延娇, 女, 技师, 主要从事临床检验研究。△ 通信作者, E-mail: zhongm111@126.com。

蒙 EUROBlotMaster 全自动免疫印迹仪,淋巴细胞亚群检测试剂、FACS Canto II 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 方法 采用间接免疫荧光试验(IFA)检测 ANA,起始稀释度为 1:100;采用免疫印迹试验(LIA)检测 ANA 谱;采用流式细胞术检测 T 淋巴细胞、辅助性 T 淋巴细胞、细胞毒性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞和 B 淋巴细胞绝对值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计学处理。经 K-S 正态检验,外周血淋巴细胞亚群绝对值等结均不服从正态分布,采用中位数描述数据的集中趋势,并使用非参数 Mann-Whitney *U* 检验比较组间差异,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 试验组与对照组外周血淋巴细胞亚群绝对值比较 试验组辅助性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞和 B 淋巴细胞绝对值明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 1。

表 1 试验组与对照组外周血淋巴细胞亚群绝对值比较(cells/ μ L)

组别	<i>n</i>	T 淋巴细胞	细胞毒性 T 淋巴细胞	辅助性 T 淋巴细胞	NK 淋巴细胞	B 淋巴细胞
试验组	200	1 130	434	578	163	190
对照组	196	1 289	444	727	208	252
<i>P</i>		0.096	0.582	0.003	0.001	0.001

2.2 试验组外周血淋巴细胞亚群绝对值比较 试验组中,采用 IFA 检出 139 例(IFA 组),采用 LIA 检出 61 例(LIA 组);IFA 组辅助性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞绝对值明显低于 LIA 组,差异有统计学意义($P<0.01$)。见表 2。

表 2 IFA 组与 LIA 组外周血淋巴细胞亚群绝对值比较(cells/ μ L)

组别	<i>n</i>	T 淋巴细胞	细胞毒性 T 淋巴细胞	辅助性 T 淋巴细胞	NK 淋巴细胞	B 淋巴细胞
IFA 组	139	1 114	432	518	150	183
LIA 组	61	1 220	436	728	231	196
<i>P</i>		0.099	0.743	0.001	0.001	0.307

3 讨 论

机体在正常情况能够识别“自我”,对自身成分不产生免疫应答,而在某些情况下,机体免疫系统也会对自身成分发生免疫应答,产生针对自身成分的自身抗体或自身反应性 T 淋巴细胞,从而发生 AID^[4]。淋巴细胞在免疫反应中起重要作用,是细胞免疫和体液免疫的重要环节。

根据淋巴细胞在机体免疫应答过程中发挥的功能,可分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞,其中辅助性 T 淋巴细胞是免疫调节的重要环节。本研究中,试验组辅助性 T 淋巴细胞绝对值明显低于对照组($P<0.01$),提示其在自身免疫中发挥了一定的作用。辅助性 T 淋巴细胞根据细胞的表型、功能和分泌的细胞因子,可分化为辅助性 T 细胞(Th)1、Th2、Th17 等。Th1 细胞可产生白细胞介素(IL)-2、IL-3、 γ -干扰素、肿瘤坏死因子 β 等,主要介导细胞内免疫,通过增强 NK 细胞的细胞毒性作用和激发 IV 型变态反应参与细胞免疫;Th2 细胞可分

泌 IL-4、IL-5、IL-10 等,主要与细胞外免疫有关,能促进抗体的产生参与体液免疫;Th17 细胞可分泌 IL-17、IL-21 和 IL-22,主要与免疫性疾病的炎症放大、强烈炎性反应有关,能促进 B 淋巴细胞的增殖,从而促进自身抗体的产生^[5-6]。有学者在对系统性红斑狼疮(SLE)患者的观察中发现,辅助性 T 淋巴细胞较正常对照组明显减少^[7]。张玉玲等^[8]对 SLE 患者 Th1、Th2 类细胞因子进行分析,发现其 Th1、Th2 类细胞因子表达异常。促炎因子的过量表达和抗炎因子的相对缺乏造成 Th1/Th2 的不平衡,这可能是一些 AID 的发病原因^[9]。另有学者提出,T 淋巴细胞的稳态调节可以维持外周 T 淋巴细胞的数量,使免疫系统保持功能上的完整。当 T 淋巴细胞的数量减少时可通过稳态增殖维持其数量,但稳态增殖将导致记忆样淋巴细胞和自身反应性细胞增加,同时增加 AID 发生的可能性^[10]。

B 淋巴细胞在机体免疫应答中同样发挥重要功能,主要是通过产生抗体和递呈抗原起到免疫调节作用。根据是否表达 CD5 分子,可将 B 细胞分为 CD5⁺ B1 细胞和 CD5⁻ B2 细胞。B1 细胞主要参与固有免疫,能产生致病性自身抗体,介导自身免疫损伤,与 AID 的发生相关;B2 细胞则通过产生抗体参与体液免疫^[11]。王云萍等^[6]对类风湿关节炎患者 B 淋巴细胞进行分析,发现其水平明显高于正常对组,提示 B 淋巴细胞活跃参与自身免疫。在 AID 中,B 淋巴细胞可以释放自身抗体损伤靶组织,然而其所释放的自身抗体可以通过清除凋亡细胞、减少自身抗原负载,对机体产生保护性作用,其中发挥免疫抑制作用的是 B 淋巴细胞中的调节性 B 细胞(Bregs)。Bregs 通过产生 IL-10 和肿瘤生长因子- β 1,抑制促炎症因子的产生,表达共同刺激 Fas 配体和程序性死亡配体 1,促进致病性细胞的死亡或凋亡,以此发挥其免疫抑制作用^[12-13]。本研究中,试验组 B 淋巴细胞绝对值明显低于对照组($P<0.01$),这可能是由于 Bregs 缺失造成免疫抑制功能减弱,从而导致 AID 的发生。

NK 淋巴细胞不表达特异性抗原识别受体,是不同于 T、B 淋巴细胞的第 3 类淋巴细胞。NK 细胞产生应答的过程十分迅速,既不需要抗原预先致敏,也不需要抗体参与,同时还可以分泌大量的细胞因子,能够早期识别病毒感染和肿瘤细胞等。NK 淋巴细胞对 T、B 淋巴细胞具有调节作用。有研究表明,在 SLE 活动期,NK 淋巴细胞数量减少,导致其对 T、B 淋巴细胞免疫调节作用减弱,从而导致多种自身抗体的产生^[14]。常炳庆等^[15]对自身免疫相关疾病患者外周血淋巴细胞亚群进行研究,发现患者组的 NK 淋巴细胞绝对值明显低于对照组,与本研究结果一致。NK 淋巴细胞数量减少,对自身抗体的抑制作用减弱,从而使多种自身抗体产生。

IFA 是 AID 诊断的标准方法,能检出细胞核、细胞浆、细胞骨架、细胞周期等各种自身抗体,检测范围较广;而 LIA 作为一种 ANA 谱的特异性抗体确认方法,检测的是包被在反应膜条上的多种高度纯化、重组抗原物质,检测有一定的局限性^[16]。本研究进一步分析试验组中淋巴细胞亚群的差异,发现 IFA 组辅助性 T 淋巴细胞、NK 淋巴细胞绝对值明显低于 LIA 组($P<0.01$),这可能是由于一些尚无法人工合成或纯化抗体的存在影响了 IFA 组中阳性患者的淋巴细胞数量。

综上所述,淋巴细胞亚群的表达异常可能与自身抗体的产生有关,T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 淋巴细胞的改变在自身免疫中发挥了重要作用。通过检测外周血淋巴细胞亚群,可了解机体的免疫状态,正确判断病情和监测(下转第 3124 页)

检测阳性检出率高于外周血。本研究发现脑脊液 T-SPOT. TB 检测灵敏度和阴性预测值均高于外周血 T-SPOT. TB 检测,与张秀英等^[11]研究结果类似。

在应用 T-SPOT. TB 检测时,对脑脊液分离出的单个核细胞需要在 4 h 内完成检测,标本存放时间越长,细胞计数虚假率越高。虽然本研究表明了 T-SPOT. TB 对 TBM 具有较高的灵敏性和特异性,但仍存在一定的局限^[12],如:TBM 的判断主要根据影像学检查、脑脊液特点和对抗结核药物反应性,传统 MTB 培养、脑脊液细胞涂片等多灵敏度较低缺乏微生物证据;其次纳入病例中合并心脑血管疾病、中枢神经系统肿瘤等,患者免疫力低下,对检测结果是否存在影响尚不清楚。综上所述,外周血和脑脊液 T-SPOT. TB 可提高 TBM 的诊断准确性,且脑脊液 T-SPOT. TB 检测灵敏性高于外周血 T-SPOT. TB 检测。

参考文献

[1] 傅钰,王永斌,何军兰,等. 联合检测脑脊液中腺苷脱氨酶和结核杆菌 DNA 对结核性脑膜炎的诊断价值[J]. 临床内科杂志,2014,31(9):625-626.

[2] 李毅,于学忠,王仲,等. 结核性脑膜炎的早期诊断标准分析[C]. 中华内科杂志,2007,46(3):217-219.

[3] 牟向欣. TB-DNA,分枝杆菌快速培养和 T-SPOT. TB 及联合检测对结核性脑膜炎的诊断价值[J]. 当代医学,2015,21(14):46-47.

[4] Lu D,Chen C,Yu S,et al. Diagnosis of tuberculous meningitis using a combination of peripheral blood T-SPOT. TB and cerebrospinal fluid interferon- γ detection methods

[J]. Lab Med,2016,47(1):6-12.

[5] Rajeev T,Renu G,Smita S. Laboratory diagnosis of tuberculous meningitis—Is there a scope for further improvement? [J]. J Lab Physicians,2010,2(1):21-24.

[6] 王娟娟,马利. 不同检测方法在结核性脑膜炎诊断中的应用价值[J]. 中国医药导报,2017,14(16):119-122.

[7] 陆迪雅,陈澍,高有方,等. 外周血结核感染 T 淋巴细胞斑点试验和脑脊液 γ 干扰素检测诊断结核性脑膜炎的价值[J]. 中华传染病杂志,2014,32(6):338-342.

[8] 陶学芳,王建华,李永兴,等. 结核感染 T 细胞酶联免疫斑点试验在肺结核及肺外结核诊断中的价值[J]. 浙江预防医学,2012,24(11):4-7.

[9] 陆建红,吴奕征,杨勇,等. 结核 T 细胞酶联免疫斑点试验诊断结核性脑膜炎的应用价值[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(6):816-818.

[10] 崔中锋,刘春礼,李格,等. T-SPOT. TB 在结核性脑膜炎早期诊断中的价值[J]. 中国实用神经疾病杂志,2016,19(16):97-98.

[11] 张秀英,吴若芬,范学文. T-SPOT. TB 法检测脑脊液单个核细胞对结核性脑膜炎早期诊断价值的研究[J]. 中国现代神经疾病杂志,2013,13(2):110-115.

[12] Park KH,Lee MS,Lee SO,et al. Kinetics of T-cell-based assays on cerebrospinal fluid and peripheral blood mononuclear cells in patients with tuberculous meningitis[J]. Korean J Intern Med,2014,29(6):793-799.

(收稿日期:2017-04-02 修回日期:2017-07-16)

(上接第 3121 页)

临床疗效,对全面了解患者的免疫状态有重要的诊疗价值。

参考文献

[1] 李炎梅,谭毅. 抗核抗体的研究进展[J]. 中国临床新医学,2013(8):814-817.

[2] 胡宗海,吴丽娟,谢静等. 淋巴细胞亚群在系统性红斑狼疮患者治疗中的临床意义[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(20):2304-2305.

[3] 薛云红,侯瑞生,周言等. HIV 感染者外周血 T 淋巴细胞亚群数量及功能与疾病进展的关系[J]. 当代医学,2013,19(29):51-52.

[4] 王兰兰,许化溪. 临床免疫学检验[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2012:274.

[5] 辛苗苗,王吉波. T 淋巴细胞发育分化与自身免疫性疾病[J]. 医学综述,2010,16(21):3243-3246.

[6] 王云萍,董佳莉. 类风湿关节炎患者淋巴细胞亚群分析[J]. 临床医药实践,2016,25(12):911-913.

[7] 任娜,赵威,邱广斌,等. 系统性红斑狼疮患者的外周血淋巴细胞亚群结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(20):2449-2451.

[8] 张玉玲,朱芸,李明. 系统性红斑狼疮患者 T 淋巴细胞亚群及 Th1、Th2 类细胞因子变化的临床意义[J]. 山东医药,2011,51(49):75-76.

[9] 李志,杨婷婷,徐维家. CD4⁺ T 淋巴细胞与自身免疫性疾病的关系研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(23):2891-2894.

[10] 张玉高,石桂秀. T 淋巴细胞稳态增殖与自身免疫[J]. 实用医院临床杂志,2011,8(2):57-60.

[11] 唐雪梅. B 淋巴细胞的分化发育与自身免疫性疾病[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(21):1611-1613.

[12] 王茜,刘翠娥,焦艳梅,等. B 细胞的自身免疫与免疫调节[J]. 北京医学,2013,35(3):210-212.

[13] 李小燕,李旭. 调节性 B 淋巴细胞在自身免疫性疾病中的研究进展[J]. 国际免疫学杂志,2014,37(4):294-298.

[14] Spada R,Rojas JM,Barber DF. Recent findings on the role of natural killer cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus[J]. J Leukoc Biol,2015,98(4):479-487.

[15] 常炳庆,邹煦,韩玉霞,等. 自身免疫相关疾病患者外周血淋巴细胞亚群检测及其意义[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(8):30-32.

[16] 陈遛琼,赵迪,邓晓刚,等. 抗核抗体核型与抗核抗体谱检测结果对比分析[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(14):1859-1863.

(收稿日期:2017-03-23 修回日期:2017-07-12)