论著·临床研究

强直性脊柱炎与 HLA-B27 的表达及 T 淋巴细胞亚群和细胞因子相关性分析*

邓菊慧，李志强△，张 睿，李艳梅
（成都军区总医院检验科，四川成都 610083）

摘 要：目的 探讨强直性脊柱炎（AS）与 HLA-B27、T 淋巴细胞亚群及部分细胞因子之间的相关性，为 AS 的诊断、治疗及预后提供帮助。**方法** 收集 131 例 AS 患者及 50 例健康人（健康对照组）外周血标本，采用流式细胞术检测外周血中 T 淋巴细胞亚群及 HLA-B27 的表达情况，固相夹心法化学发光免疫量度法对血清 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 等细胞因子进行定量检测。**结果** AS 患者与健康对照组比较，$CD3^+CD4^-CD8^+$ T（T8 细胞）、IL-8、TNF-α 升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），$CD3^+$ T（总 T 细胞）、$CD3^+CD4^+CD8^-$ T（T4 细胞）、T4/T8、IL-1β、IL-6 差异无统计学意义（$P>0.05$）。HLA-B27 阳性 AS 患者和 HLA-B27 阴性 AS 患者比较，T 淋巴细胞亚群和上述细胞因子间均无显著差异（$P>0.05$）。AS 患者 HLA-B27 不同荧光强度组别间上述各指标均无显著差异（$P>0.05$）。**结论** HLA-B27、T 淋巴细胞亚群和细胞因子 IL-8、TNF-α 的检测有助于提高 AS 诊断敏感性，对判断 AS 病情的发展转归有一定价值，HLA-B27 的荧光表达强弱可能不反映 AS 病情进展情况。

关键词：强直性脊柱炎； HLA-B27； T 淋巴细胞亚群； 细胞因子
DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.011 **中图法分类号：**R593.23
文章编号：1673-4130(2018)16-1976-04 **文献标识码：**A

The correlation ananlysis of HLA-B27 expression and lymphocytes subsets, cytokines in the patients with ankylosing spondylitis*

DENG Juhui, LI Zhiqiang△, Zhang Rui, LI Yanmei
(*Department of Clinical Laboratory, Chengdu Military General Hospital, Chengdu, Sichuan* 610083, *China*)

Abstract: Objective To study the correlation of the HLA-B27 and T lymphocytes subsets and some cytokines of the ankylosing spondylitis(AS) patients, so as to help the diagnosis, treatment and prognosis of AS. **Methods** In the study 50 healthy controls and 131 patients with ankylosing spondylitis were selected as the research objects. The peripheral blood samples of 131 AS patients and 50 healthy people (healthy control group) were collected. Flow cytometry was used to detect the expression of T lymphocyte subsets and HLA-B27 in peripheral blood. The serum IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α were measured by solid phase sandwich chemiluminescence immunoassay. **Results** Compared with the healthy control group, the $CD3^+CD4^-CD8^+$ T (T8 cell), IL-8 and TNF-α were increased in AS patients, and the difference was statistically significant ($P<0.05$), $CD3^+$ T (total T cells), $CD3^+CD4^+CD8^-$ T cells (T4 cell), T4/T8, IL-1β and IL-6 had no statistical significance ($P>0.05$). There was no significant difference in T lymphocyte subsets and cytokines between HLA-B27 positive AS patients and HLA-B27 negative AS patients ($P>0.05$). There was no significant difference in the above indexes among AS patients with different HLA-B27 fluorescence intensities ($P>0.05$). **Conclusion** The detection of HLA-B27, T lymphocyte subsets and cytokine IL-8, TNF-α can help to improve the sensitivity of AS diagnosis, and have some value to assess the prognosis of AS, and the fluorescence intensity of HLA-B27 may not reflect the progression of AS.

Key words: ankylosing spondylitis; HLA-B27; T lymphocytes subsets; cytokines

---

* **基金项目：**国家自然科学基金青年科学基金资助项目（31400128）；成都军区总医院创新人才项目（2016KC04）。
作者简介：邓菊慧，女，主管检验技师，主要从事分子诊断研究。 △ **通信作者**，E-mail：lzqsailor@163.com。
本文引用格式：邓菊慧，李志强，张睿，等. 强直性脊柱炎与 HLA-B27 的表达及 T 淋巴细胞亚群和细胞因子相关性分析[J]. 国际检验医学杂志，2018，39(16)：1976-1979.

强直性脊柱炎(AS)是一种以骶髂关节和脊柱炎症为主要特征,原因不明的慢性自身免疫性疾病,其发病机制尚不完全清楚,虽然研究证实人类白细胞抗原 B27 阳性(HLA-B27$^+$)与 AS 有强相关性[1],AS 患者 HLA-B27 的阳性率高达 90%以上,但是研究也发现某些其他疾病也与 HLA-B27 有关,而健康人群中也有 HLA-B27 表达[2-3]。所以 HLA-B27 阳性不能作为早期确诊 AS 的标准,只能作为参考。因此,在检测 HLA-B27 的基础上进行淋巴细胞亚群及细胞因子的检测比较,对早期鉴别诊断 AS 和非 AS 疾病有很大意义[4-6]。本研究以 HLA-B27 阳性的 AS 患者、HLA-B27 阴性的 AS 患者为研究对象,以 HLA-B27 阴性的健康人群为对照组。通过流式细胞术观察 HLA-B27 平均荧光强度(MFI)和 T 淋巴细胞亚群的分布及细胞因子的检测,观察 HLA-B27 的不同研究对象与这些免疫炎症指标的相关性,以及相互之间存在的差异性,从而辅助 AS 和非 AS 疾病的早期鉴别诊断,弥补早期单一检测 HLA-B27 指标的不足。

1　资料与方法

1.1　一般资料　样本均来源于 2015 年 6 月至 2017 年 6 月中国人民解放军成都军区总医院收治的患者,其中 HLA-B27 阳性的 AS 患者 91 例(HLA-B27 阳性 AS 组),男 84 例,女 7 例,年龄 9～63 岁,HLA-B27 阴性的 AS 患者 40 例(HLA-B27 阴性 AS 组),男 32 例,女 8 例,年龄 20～50 岁,所有 AS 患者均经临床确诊。健康对照组 50 例,为同期本院健康体检者,且 HLA-B27 均为阴性,其中男性 45 例,女 5 例,年龄 18～45 岁,无发热、自身免疫性疾病,急慢性炎症,肿瘤、心血管疾病等相关疾病,未使用任何药物。

1.2　诊断标准　诊断标准为 1984 年修订的纽约标准[7]:(1)下腰背痛的病程至少持续 3 个月,疼痛随活动改善,但休息不减轻;(2)腰椎在前后和侧屈方向活动受限;(3)胸廓扩展范围小于同年龄和性别的正常值;(4)双侧骶髂关节炎Ⅱ～Ⅳ级,或单侧骶髂关节炎Ⅲ～Ⅳ级。如果患者具备第 4 条并分别附加第 1～3 条中的任何 1 条,则可确诊为 AS。

1.3　仪器与试剂　HLA-B27 和 T 淋巴细胞亚群采用美国 BD FACSCantoⅡ流式细胞仪进行检测,细胞因子采用 SIEMENS 公司的 IMMULITE1000 仪器进行检测。主要试剂:HLA-B27 采用 BD 公司生产的 HLA-B27-FITC/CD3-PE,T 淋巴细胞亚群采用 BD 公司生产的 CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP 混合抗体,细胞因子试剂均为 IMMMULITE 生产。

1.4　方法

1.4.1　标本采集　清晨空腹采集静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K_2)抗凝,室温保存,24 h 内流式细胞仪上机检测,同时抽取 5 mL 于分离胶促凝管中,静置后经 3 000 r/min 离心 10 min,分离出血清用于细胞因子的检测。

1.4.2　流式细胞术检测 HLA-B27 和 T 淋巴细胞亚群　取 2 只试管分别加入 30 μL 检测 HLA-B27-FITC/CD3-PE 单抗试剂和 20 μL CD4-FITC/CD8-PE/CD3-PerCP 混合荧光抗体到试管底部,分别将 50 μL 充分混匀的 EDTA-K2 抗凝的静脉全血加进试管底部,低速混匀 3 s,室温避光静置 30 min,加入 1 000 μL 溶血剂,低速混匀,室温避光 10 min,随后室温 1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入 2 000 μL 缓冲液,低速混匀,室温 1 500 r/min 离心 5 min 弃去上清液,加入 500 μL PBS,低速混匀,随即上机检测,记录数据,以 HLA-B27 荧光强度检测值大于 148 判为阳性,同时分析各亚群占淋巴细胞的百分比。

1.4.3　细胞因子检测　采用固相夹心法化学发光免疫量度检测,标本 3 000 r/min 离心 10 min,分离的血清采用本室 SIEMENS 公司的 IMMULITE1000 仪器进行细胞因子 IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α 检测。健康成人 IL-1β 的参考范围 0～5 pg/mL,以 IL-1β＞5 pg/mL 为阳性;IL-6 的参考范围为 0 ～11.53 pg/mL,以 IL-6＞11.53 pg/mL 为阳性;IL-8 的参考范围为 0 ～62.0 pg/mL 以 IL-8＞62.0 pg/mL 为阳性;TNF-α 的参考范围为 0 ～8.1 pg/mL 以 TNF-α＞8.1 pg/mL 为阳性。

1.5　统计学处理　应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理和分析,多组比较采用方差分析,2 组间比较采用 Student t 检验和 K 检验及相关性分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　　果

2.1　各组 T 淋巴细胞亚群结果和细胞因子表达情况分析　与健康对照组比较,HLA-B27 阳性 AS 组 $CD3^+CD4^-CD8^+$ T 细胞(T8 细胞)百分率升高,T4/T8 比值降低,差异有统计学意义($P<0.05$),$CD3^+$ T 细胞(总 T 细胞)和 $CD3^+CD4^+CD8^-$ T 细胞(T4 细胞)百分率差异无统计学意义($P>0.05$),IL-8 和 TNF-α 升高,差异有统计学意义($P<0.05$),IL-1β 和 IL-6 差异无统计学意义($P>0.05$);但 HLA-B27 阴性 AS 组与健康对照组之间,总 T 细胞、T4 细胞、T8 细胞、T4/T8、IL-1β 和 IL-6 差异无统计学意义($P>0.05$),HLA-B27 阴性 AS 组 IL-8 和 TNF-α 高于健康对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。HLA-B27 阳性 AS 组和 HLA-B27 阴性 AS 组之间总 T 细胞、T4 细胞、T8 细胞、T4/T8 差异均无统计学意义($P>0.05$),IL-1β、IL-6、IL-8 和 TNF-α 差异也均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

2.2　HLA-B27 荧光检测强度与 T 淋巴细胞亚群和细胞因子相关性分析　将 HLA-B27 平均荧光强度(MFI)＞148 判定为阳性,将 AS 患者按不同 MFI 分为 4 个亚组,各组间 T 淋巴细胞各亚群比例(总 T 细

胞、T4 细胞、T8 细胞、T4/T8）及血清细胞因子（IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α）水平差异均无统计学意义（$P>0.05$），见表 2。

2.3　各组细胞因子阳性率比较　HLA-B27 阳性 AS 组与 HLA-B27 阴性 AS 组 IL-8 和 TNF-α 阳性率均显著高于健康对照组（$P<0.05$），见表 3。

表 1　不同组别 T 淋巴细胞亚群与细胞因子检测结果比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	总 T 细胞(%)	T4 细胞(%)	T8 细胞(%)	T4/T8	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
HLA-B27 阳性 AS 组	91	68.33±9.39	35.95±7.81	26.02±6.98*	1.43±0.50*	3.32±1.45	4.72±4.24	47.08±51.76*	63.51±83.95*
HLA-B27 阴性 AS 组	40	67.11±9.01	34.72±6.23	27.33±7.52*	1.40±0.60*	3.01±1.70	5.32±5.12	49.12±47.24*	60.35±77.21*
健康对照组	50	66.95±8.57	33.16±7.75	23.6±5.74	1.48±0.40	2.77±0.98	4.02±2.85	9.79±13.42	2.80±1.68

注：与健康对照组比较，* $P<0.05$

表 2　不同 HLA-B27 MFI 表达强度 AS 患者 T 淋巴细胞亚群与细胞因子检测结果比较（$\bar{x}\pm s$）

MFI	n	总 T 细胞(%)	T4 细胞(%)	T8 细胞(%)	T4/T8	IL-1β(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-8(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)
>170	10	68.49±8.09	33.05±8.29	28.88±11.04	1.31±0.56	3.72±1.54	8.33±5.80	63.41±41.99	51.63±43.86
161～170	48	66.28±8.41	33.59±7.03	27.13±7.28	1.32±0.42	3.20±1.38	3.56±2.85	34.90±46.56	83.25±115.98
149～160	33	68.79±9.97	37.12±8.04	24.91±5.07	1.58±0.50	3.32±1.49	4.76±4.33	53.58±56.17	54.58±59.02
<148	40	70.32±9.53	38.33±5.98	26.13±10.51	1.61±0.50	3.18±1.66	6.12±5.13	34.33±41.55	34.43±24.87

表 3　各组细胞因子阳性率比较[n(%)]

组别	n	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
HLA-B27 阳性 AS 组	91	9(9.9)	11(12.1)	52(57.1)*	70(76.9)*
HLA-B27 阴性 AS 组	40	3(7.5)	5(12.5)	24(60.0)*	29(72.5)*
健康对照组	50	0(0.0)	0(0.0)	1(2.0)	1(2.0)

注：与健康对照组比较，* $P<0.05$

3　讨　论

HLA-B27 与 AS 具有很强的相关性，但 AS 的发病机制尚未完全阐明，目前公认的假说是致关节炎肽假说（分子模拟假说），HLA-B27 呈递的外源性抗原肽与自身抗原肽存在交叉反应，发生针对自身抗原肽的细胞毒性免疫反应。关节源性肽只存在于关节组织中，特异性地由 HLA-B27 表达，但在正常情况下，其表达水平极低，细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）在胸腺发育过程中经历阳性和阴性选择后，既不能诱导克隆删除，也不能激发免疫应答（即呈现免疫耐受），当机体受到某些具有结构同源性蛋白的病毒或细菌感染时，则可致敏耐受的 T 细胞，从而识别以低水平表达的关节源性肽，引起自身免疫反应而损伤组织，组织损伤后释放的自身抗原又进一步扩大这种自身免疫。其他还包括蛋白质错误折叠理论，HLA-B27 游离重链二聚体假说，以及微生物失调与肠道炎症假说等，表明 AS 的发病是由多因素导致的免疫学疾病，重视免疫学指标的检测将有助于 AS 的诊断和治疗[8]。

本研究收集了 131 例 AS 患者外周血标本，与健康对照组比较，HLA-B27 阳性 AS 患者外周血 T8 细胞比例升高，差异有统计学意义（$P<0.05$），总 T 细胞和 T4 细胞比例升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。而与健康对照组比较，HLA-B27 阴性 AS 患者 T4 细胞比例升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$），表明 T4 细胞可能在 HLA-B27 参与 AS 发病中起到一定作用，联合检测 HLA-B27 和 T 淋巴细胞亚群有助于提高 AS 诊断的敏感性。多个研究表明，与健康人比较，AS 患者外周血 T 淋巴细胞亚群均有变化，但研究结果并不十分一致，可能与检测标本收集的标准不同有关[9-12]。

IL-8 和 TNF-α 属炎症因子，起调节免疫功能的作用，本研究发现，与健康对照组比较，HLA-B27 阳性 AS 患者与 HLA-B27 阴性 AS 患者血清中 IL-8 和 TNF-α 水平均升高（$P<0.05$），IL-8 阳性率（异常率）分别为 57.1% 和 60.0%，TNF-α 阳性率分别为 76.9% 和 72.5%，表明 IL-8 和 TNF-α 可能与 AS 疾病的活动性有关，二者对判断 AS 病情的发展及转归有一定价值[13]。另外，HLA-B27 阳性 AS 患者与 HLA-B27 阴性 AS 患者血清中 IL-8 和 TNF-α 水平无明显差异，表明二者可能不是 HLA-B27 参与 AS 发病的关键因素[14-16]。对于 HLA-B27 阴性的 AS 患者，可借助血清 IL-8 和 TNF-α 辅助诊断 AS，并与 HLA-B27 阴性的健康者进行鉴别。

本研究采用流式细胞术检测外周血 HLA-B27 的表达情况，其检测的荧光强度值可以间接反映 HLA-B27 的表达情况，相关性分析显示，在 HLA-B27 阳性

的 AS 患者，HLA-B27 荧光检测强度与 T 淋巴细胞各亚群比例和血清细胞因子水平均无明显相关性，同时依据 HLA-B27 荧光强度检测值不同将样本分为 4 组，各组之间 T 淋巴细胞亚群和细胞因子水平无明显差异，表明 HLA-B27 表达强弱不能反映 AS 病情进展情况，具体还应结合临床症状及影像学指标进行综合分期。

4　结　　论

本研究探讨了 AS 患者中，HLA-B27、T 淋巴细胞亚群及部分细胞因子之间的相关性，发现 HLA-B27、T 淋巴细胞亚群和细胞因子 IL-8、TNF-α 的检测有助于提高 AS 诊断敏感性，对判断 AS 病情的发展转归有一定价值，可为 AS 的诊断、治疗及预后提供帮助。

参考文献

[1] CASTRO-SANTOS P, GUTIERREZ MA, DIAZ-PENA R. Genetics of ankylosing spondylitis[J]. Rev Med Chile, 2014, 142(9): 1165-1173.

[2] 蔡春水，肖平. 强直性脊柱炎患者外周血调节性 T 淋巴细胞分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志，2013，27(12)：1192-1194.

[3] SATO DK, NAKASHIMA I, BAR-OR A, et al. Increased levels of Th17 cells are associated with non-neuronal acetylcholine in COPD patients[J]. J Neuroimmunol, 2014, 268(1/2): 95-98.

[4] 杨向红，孙仁华，陈敏华，等. 可溶性髓细胞触发受体-1 对呼吸机相关性肺炎的早期诊断价值[J]. 中华急诊医学杂志，2014，23(2)：200-203.

[5] 郑红丽. 右美托咪定对急性肺损伤患者免疫炎性反应影响及临床作用[J]. 现代中西医结合杂志，2015，24(18)：1954-1957.

[6] 尤金彪，毛向红，董浙清，等. HLA-B27$^+$ 的强直性脊柱炎与非强直性脊柱炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群及免疫炎症指标分析[J]. 中国卫生检验杂志，2016，26(14)：2039-2044.

[7] VAN DER LINDEN S, VALKENBURG H A, CATS A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria [J]. Arthritis Rheum, 1984, 27 (4): 361-368.

[8] 王永访，许联红，蒋立新，等. 强直性脊柱炎患者免疫功能的检测及临床意义[J]. 现代检验医学杂志，2012，27(6)：132-134.

[9] SARNY S, LINDNER E, EL-SHABRAWI Y. IL-23 gene in intermediate and HLA-B27-associated uveitis[J]. Acta Ophthalmol, 2016, 94(7): 662-663.

[10] COLBERT R A, TRAN T M, LAYH-SCHMITT G. HLA-B27 misfolding and ankylosing spondylitis[J]. Mol Immunol, 2014, 57(1): 44-51.

[11] YANG T, DUAN Z, WU S, et al. Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis[J]. Mod Rheumatol, 2014, 24(1): 150-161.

[12] 金艳华，张志国，周凌，等. 强直性脊柱炎患者外周记忆性 T 细胞亚群及功能初探[J]. 现代免疫学，2015，35(3)：177-181.

[13] 赵丽珂，古洁若，余得恩. 细胞因子对 HLA-B 27 启动子的调节作用及其在强直性脊柱炎发病机制中的意义[J]. 中国病理生理杂志，2007，23(12)：2455-2459.

[14] DIYARBAKIR E, EYERCI N, MELIKOGLU M, et al. HLA B27 subtype distribution among patients with ankylosing spondylitis in eastern Turkey[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2012, 16(5): 456-458.

[15] 黄建武，黄建华，黄影. 肿瘤坏死因子-α 在强直性脊柱炎活动期患者中的表达[J]. 中医正骨，2013，25(11)：22.

[16] BOWNESS P. HLA-B27[J]. Annu Rev Immunol, 2015, 33(1): 29-48.

（收稿日期：2018-01-12　修回日期：2018-03-30）

（上接第 1975 页）

fibrillation[J]. ACC Curr J Rev, 2004, 13 (3): 64.

[20] ARONSON D, BOULOS M, SULEIMAN A, et al. Relation of C-reactive protein and new-onset atrial fibrillation in patients with acute myocardial infarction[J]. Am J Cardiol, 2007, 100(5): 755-759.

[21] CHUNG M K, MARTIN D O, SPRECHER D, et al. C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation[J]. Circulation, 2001, 104 (24): 2886-2891.

[22] GÜNAY E, SARINÇ ULASLI S, AKAR O, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in chronic obstructive pulmonary disease: a retrospective study [J]. Inflammation, 2014, 37(2): 374-380.

[23] ALTINTAS N, ÇETINOGLU E, YUCEEGE M, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in obstructive sleep apnea: a multi center, retrospective study[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(17): 3234-3240.

[24] HORNE B D, ANDERSON J L, JOHN J M, et al. Which white blood cell subtypes predict increased cardiovascular risk? [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(10): 1638-1643.

（收稿日期：2018-01-08　修回日期：2018-03-26）