

· 短篇论著 ·

类风湿性关节炎患者淋巴细胞和 Treg/Th17 平衡的检测及意义

李智伟^{1,2}, 田永芳¹, 卢佩佩¹, 刘小双¹, 岳晓媚¹, 王昌敏^{1△}

(1. 新疆维吾尔自治区人民医院临床检验中心, 新疆乌鲁木齐 830001; 2. 新疆医科大学基础医学院, 新疆乌鲁木齐 830011)

摘要:目的 通过对类风湿性关节炎(RA)患者外周血的淋巴细胞亚群和调节性 T 细胞(Treg)、辅助性 T 细胞 17(Th17)的检测,探讨淋巴细胞亚群变化和 Treg/Th17 平衡与 RA 疾病的关系。方法 采用流式细胞术对 65 例 RA 患者(RA 组)和 67 例体检健康者(健康对照组)的外周血中的 T、B、NK 细胞及 Treg、Th17 细胞的表型和数量进行检测。结果 与健康对照组相比,RA 组患者的 CD4 比例明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);CD8 比例明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$);CD4/CD8 比值显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。B 细胞和 NK 细胞比例无明显变化;RA 患者的 T、B、NK 细胞绝对计数均比健康对照组低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。RA 组患者的 Treg 细胞比例较健康对照组有所下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);Th17 细胞比例较健康对照组明显上升,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 RA 患者存在淋巴细胞亚群改变和 Treg/Th17 比例失衡,这些表现可能与 RA 发病机制相关。

关键词:类风湿性关节炎; 调节性 T 细胞; 辅助性 T 细胞 17

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.16.028

中图法分类号:R593.22

文章编号:1673-4130(2019)16-2026-03

文献标识码:B

类风湿性关节炎(RA)是以关节肿痛,滑膜关节破坏为特征的一种自身免疫性疾病。该病女性多发,年龄分布广泛,致残率较高^[1]。目前其发病原因尚不完全清楚,研究报道淋巴细胞在疾病的发病和进展中均发挥重要作用^[2]。淋巴细胞包括 T、B、NK 细胞,T 细胞又分为辅助性 T 细胞(CD4⁺)和细胞毒 T 细胞(CD8⁺)。CD4⁺T 在一定条件下可分化成辅助性 T 细胞 1(Th1)、Th2、Th17、调节性 T 细胞(Treg)等不同亚型,进而调控免疫应答。Th17 细胞介导炎症反应,Treg 细胞介导免疫抑制,两者的分化过程和功能相互拮抗。Th17/Treg 失衡可导致机体的损害。本文通过分析 RA 患者和健康人群的 T、B、NK 细胞的分布及 Treg 和 Th17 细胞在 RA 患者中的平衡变化,探讨 Th17/Treg 平衡与 RA 疾病之间的关系,为临床免疫治疗提供一定的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 6—12 月新疆维吾尔自治区人民医院住院的 RA 患者 65 例为 RA 组,其中男 18 例,女 47 例;年龄 37~74 岁,平均(55.6±10.1)岁;汉族 36 例,其他民族 29 例。RA 组纳入标准:符合美国风湿病学会与欧洲风湿病防治联合会 2010 年制定的 RA 诊断标准^[3]。排除标准:排除患有肿瘤、其他自身免疫病和感染疾病的者。选择 67 例体检健康者作为健康对照组,其中男 20 例,女 47 例;平均(52.5±11.3)岁。经统计分析各组性别、年龄、民族差异均无统计学意义($P > 0.05$)。所有研究对象

均都被告知标本采集的目的并签署知情同意书。

1.2 仪器与试剂 FACSCantoII 流式细胞仪(美国 BD 公司);试剂: Multitest IMK Kit (340503); CD3-FITC (555339); CD3-PerCP(552851); CD4-FITC(555346); CD4-PE(555347); IL-17A-PerCP(560666); CD127-PE(561028); CD25-APC (555434); IgG1-PE (555749)、IgG1-APC (550854)、BD Cytometer Setup&Tracking Beads Kit (641319)以及溶血素(349202)、破膜剂(641776)、Trucount 绝对计数管(340334)和 Falcon 流式进样管均购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 所有研究对象均于清晨空腹采集全血 2 mL,使用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝,标本于室温保存,当日完成上机检测。

1.3.2 流式细胞仪检测 T、B、NK 淋巴细胞 使用两个 Trucount 的计数管,一管加入 50 μL 全血和 20 μL Multitest IMK Kit A 试剂(CD3/CD8/CD45/CD4),第二管加入 50 μL 全血和 20 μL Multitest IMK Kit B 试剂(CD3/CD16⁺56/CD45/CD19)。震荡混匀避光放置 15 min 后加入 450 μL 溶血素,放置 15 min 后上机。每次检测前使用 BD Cytometer Setup&Tracking Beads Kit 进行质控,必要时调整机器电压和补偿。结果使用 BD Canto 软件进行自动检测分析。

1.3.3 流式细胞仪检测 Treg 和 Th17 细胞 Treg 细胞设置两管,一管试验管,加入 CD4-FITC、CD3-PerCP、CD25-APC、CD127-PE,另一管对照管加入

△ 通信作者, E-mail: wcm224@126.com。

CD4-FITC、CD3-PerCP、IgG1-PE、IgG1-APC。孵育 15 min 后加入溶血素 2 mL, 10 min 后离心洗涤上机; Th17 细胞也设置两管, 均先加入 CD4-PE、CD3-FITC, 孵育 10 min 后加入破膜剂 A 液再孵育 5 min, 加入溶血素 10 min 后离心弃上清后加入破膜剂 B 液, 两管再分别加入 IL-17A-PE 和 IgG1-PE, 孵育 15 min 后洗涤离心弃上清后上机检测。全部试剂均加入试剂说明书推荐的剂量。每次检测前使用 BD Cytometer Setup & Tracking Beads Kit 进行质控, 必要时调整机器电压和补偿。使用 BD DIVA 软件进行分析, 以 CD3 和 CD4 设门, CD127^{low} 和 CD25⁺ 细胞为 Treg 细胞; IL-17A⁺ 细胞为 Th17 细胞。

1.4 统计学处理 用 SPSS22.0 统计学软件进行分

析, 若符合正态分布, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间数据比较采用独立样本的 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T、B、NK 细胞分析 从比例来看, 与健康对照组相比, RA 组的 CD4 比例明显增高, 差异有统计意义 ($P < 0.01$); CD8 比例明显降低, 差异有统计意义 ($P < 0.01$); CD4/CD8 比值显著增高, 差异有统计意义 ($P < 0.01$)。B 细胞和 NK 细胞构成无明显变化。见表 1。

从绝对计数来看, RA 组的 T、B、NK 细胞数量均比健康对照组低, 差异有统计意义 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 RA 组与健康对照组淋巴细胞亚群构成结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3	CD4	CD8	CD19	CD16 ⁺ CD56	CD4/CD8
对照组	67	72.66 ± 6.02	42.08 ± 5.17	28.05 ± 6.41	13.56 ± 4.86	11.82 ± 4.40	1.61 ± 0.54
病例组	65	74.82 ± 9.27	49.96 ± 6.87	23.77 ± 5.00	12.15 ± 7.34	11.03 ± 5.95	2.21 ± 0.65
<i>P</i>		0.150	0.000	0.000	0.238	0.421	0.000

表 2 RA 患者组与健康对照组淋巴细胞亚群绝对计数结果比较 (个/μL, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	T cell	CD4	CD8	B cell	NK cell
对照组	67	1 326.33 ± 183.05	773.82 ± 111.08	520.11 ± 143.65	245.69 ± 95.91	213.41 ± 184.18
病例组	65	938.32 ± 317.45	636.40 ± 234.32	296.32 ± 100.10	160.27 ± 135.49	140.83 ± 96.78
<i>t</i>		9.632	5.001	9.636	4.482	4.710
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

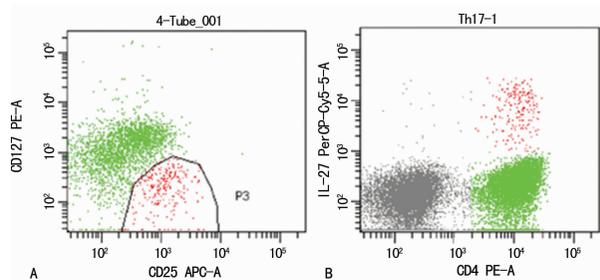
表 3 RA 组与健康对照组 Treg 和 Th17 结果比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Treg	Th17
对照组	67	7.12 ± 1.33	2.54 ± 0.66
病例组	65	6.05 ± 1.79	3.36 ± 1.09
<i>t</i>		3.54	-4.88
<i>P</i>		0.020	0.003

析, Th17 细胞较健康对照组明显上升, 差异有统计意义 ($P < 0.01$)。见表 3 和图 1。

3 讨论

RA 是一种自身免疫性疾病, RA 的发病机制与免疫系统密切相关^[4]。各类淋巴细胞通过相互作用来维持机体正常的免疫平衡, T 淋巴细胞介导细胞免疫, 辅助性 T 细胞根据机体免疫状况可以进一步分化成各类 Th 亚型细胞, 并分泌不同的细胞因子来调节免疫系统, 细胞毒 T 细胞 (Ts) 能够特异型杀伤靶细胞^[5-6]。在本研究中, RA 组的 CD4 比例高于健康对照组, CD8 比例低于健康对照组, CD4/CD8 比值高于健康对照组, B 细胞和 NK 细胞比例无明显变化, 与之前的研究相似^[7-8]。从绝对计数方面比较来看, T、B、NK 细胞数量整体低于健康对照组。RA 患者患病时, 机体的免疫平衡已被打破, 由于疾病的免疫应答改变造成 CD8 的下降较 CD4 更为显著, 在 RA 发病后 CD4 被诱导分化成各亚型的能力也发生变化。Treg 和 Th17 是近年来发现的在自身免疫性疾病中发挥重要作用的 Th 亚型^[9-10]。Th17 细胞通过分泌 IL-17、IL-21 和 IL-23 等细胞因子发挥免疫功能^[11], IL-17 是强大的促炎症因子, IL-17 增多可以放大免疫



注: A 图 CD127^{low}CD25⁺ 为 Treg 细胞, B 图 CD4⁺ IL-17⁺ 为 Th17 细胞

图 1 Treg 和 Th17 流式细胞图

2.2 Treg 和 Th17 细胞分析 RA 组患者的 Treg 细胞较健康对照组有所下降, 差异有统计意义 ($P <$

级联反应,进一步加重机体的炎性反应^[12]。Treg 细胞是负相免疫调节细胞,Treg 可以释放 IL-10、TGF- β 等细胞因子发挥抑制作用,进而避免机体产生过度的免疫反应^[13-14]。在本研究中发现 RA 患者 Treg 显著低于健康对照组,Th17 显著高于健康对照组,说明在 RA 患者体内平衡向促炎方向倾斜。健康者的免疫系统与骨骼系统之间是依靠紧密的相互作用来维持机体平衡的,RA 是平衡出现紊乱的结果,活化的 T 细胞导致破骨细胞激活并产生骨侵蚀。有报道证实,Th17 细胞通过上调滑膜成纤维细胞上的 RANKL 以及诱导局部炎性反应的方式,破坏关节炎中的骨组织^[15]。在 RA 发病时 Treg 数量和功能也均产生异常,治疗后 Treg 和 Th17 的平衡则会恢复到健康者的水平^[16-17],这些报道也证明了 Treg 和 Th17 的平衡的改变与 RA 疾病有一定的相关性。由于试验条件有限,本研究并未进一步对 Treg 和 Th17 的相关细胞因子进行检测。但是深入了解细胞亚群和细胞因子的网络调节对揭示 RA 的发病机制很有帮助^[18-19]。目前已有报道尝试使用抗肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 对 RA 进行治疗^[20],相信通过对淋巴细胞亚群及细胞因子进一步研究,能够找到很好的 RA 免疫治疗的靶点,为该病诊断和治疗提供帮助。

综上所述,本研究结果显示,RA 患者会出现淋巴细胞亚群比例改变和 Treg/Th17 比例失衡的免疫现象,说明淋巴细胞各个亚群均可能参与了 RA 发生和发展。Treg/Th17 平衡也与 RA 疾病相关,在抑制炎性反应过度 and 疾病进展加重中发挥重要的调节作用。未来可以进一步深入研究以寻找潜在的免疫治疗靶点。

参考文献

- [1] 范蓉. 类风湿关节炎的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(11): 2014-2016.
- [2] 赵艳宁, 杨帆, 彭静, 等. CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞在类风湿关节炎中的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(5): 988-990.
- [3] ALETAHA D, NEOGI T, SILMAN AJ, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative[J]. Arthritis Rheum 2010, 62(9): 2569-2581.
- [4] 王爱雪, 武丽君, 刘艳慧, 等. 抗 Sa 和抗 CCP 抗体对类风湿关节炎诊断意义的比较[J]. 新疆医学, 2013, 43(2): 23-25.
- [5] 李凡, 张升校, 李媛, 等. CD4⁺ T 细胞亚群在类风湿关节炎发病机制中的研究进展[J]. 中国药物与临床, 2018, 18(10): 1721-1723.
- [6] 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.
- [7] 仝岩, 任伟宏, 赵航, 等. 类风湿关节炎患者外周血 CD4⁺ T 细胞亚群的分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(8): 854-857.
- [8] 李学荣, 陈永平, 张榜硕, 等. 艾拉莫德联合依那西普对难治性类风湿关节炎患者 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞及免疫球蛋白的影响[J]. 免疫学杂志, 2018, 29(2): 141-145.
- [9] 索欣, 李鸿斌. Th17/Treg 细胞平衡与类风湿关节炎的研究新进展[J]. 医学综述, 2014, 20(11): 1958-1960.
- [10] 孟珊, 范韶光, 马超, 等. Th17 细胞与 Treg 细胞比例失衡对强直性脊柱炎发病的影响[J]. 中国实验诊断学, 2018, 22(8): 1364-1365.
- [11] 张婷婷, 吉晓菲, 李少游, 等. 过敏性紫癜患儿 Th17、Treg 细胞及 IL-17、IL-23 水平的测定[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(12): 1801-1804.
- [12] 韩玉明, 阿孜古丽·阿布都热合曼. 血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-17 水平与类风湿关节炎患者并发动脉粥样硬化关系研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(3): 371-373.
- [13] LIU J, HONG X Z, LIN D, et al. Artesunate influences Th17/Treg lymphocyte balance by modulating Treg apoptosis and Th17 proliferation in a murine model of rheumatoid arthritis[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5): 2267-2273.
- [14] 张莹, 周小莉. Th17/Treg 平衡在类风湿关节炎发病和治疗中的意义[J]. 中国医药导报, 2015, 12(24): 48-52.
- [15] KOMATSU N, TAKAYANAGI H. Immune-bone interplay in the structural damage in rheumatoid arthritis[J]. Clin Exp Immunol, 2018, 194(1): 1-8.
- [16] BYSTROM J, CLANCHY F I, TAHER T E, et al. TNF alpha in the regulation of Treg and Th17 cells in rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases[J]. Cytokine, 2018, 101(1): 4-13.
- [17] 徐丹, 刘筱玉, 苗苗, 等. 调节 Th17/Treg 细胞平衡: 类风湿关节炎治疗的新靶点[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2017, 11(09): 1596-1600.
- [18] ASTRY B, VENKATESHA S H, MOUDGIL K D. Involvement of the IL-23/IL-17 axis and the Th17/Treg balance in the pathogenesis and control of autoimmune arthritis[J]. Cytokine, 2015, 74(1): 54-61.
- [19] 蔡辉, 张群燕, 郭郡浩, 等. 类风湿关节炎患者外周血血浆中 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-10 的表达及临床意义[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(3): 519-521.
- [20] KIM E Y, MOUDGIL K D. Immunomodulation of autoimmune arthritis by pro-inflammatory cytokines[J]. Cytokine, 2017, 98(SI): 87-96.

(收稿日期: 2018-12-08 修回日期: 2019-03-22)