

强直性脊柱炎患者不同活动期 Treg、Th17 细胞的临床意义及其相关性^{*}

王作龙¹, 钟乃凤², 马 莉^{1* * *}

(1. 贵阳医学院附院 中心实验室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 生物与工程学院生物技术教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨强直性脊柱炎(AS)不同活动期调节性T细胞(Treg)和辅助性T细胞17(Th17)的临床意义, 分析两者之间的相关性。方法: 78例AS患者(AS组)分为低活动性AS组和高活动性AS组, 30例健康体检者作为对照组, 抽取两组受检者外周血, 应用细胞内因子染色技术及流式细胞术检测外周血Treg和Th17细胞数量, 分析Treg和Th17与AS活动性的相关性。结果: 与对照组相比, AS组和低活动性AS组外周血Treg细胞百分率的差异无统计学意义($P > 0.05$), 高活动性AS组外周血Treg细胞百分率明显降低($P < 0.01$), AS组外周血Th17细胞百分率增高($P < 0.01$), 且低活动性AS组和高活动性AS组外周血Th17细胞百分率均增高($P < 0.05$), AS组、低活动性AS组以及高活动性AS组外周血Th17/Treg的细胞比值均有增高($P < 0.01$); 与低活动性AS组相比, 高活动性AS组外周血Treg细胞明显减少($P < 0.01$), 高活动性AS组外周血Th17细胞明显增高($P < 0.01$), 高活动性AS组外周血Th17/Treg的细胞比率明显增高($P < 0.01$); 相关性分析显示, AS患者外周血Th17细胞比例与Bath强直性脊柱炎病情活动指数(BASDI)呈正相关, ($r = 0.409$) Treg细胞比例与BASDI呈负相关($r = -0.265$), Th17/Treg比率与BASDI相关性分析呈显著正相关($r = 0.459, P < 0.01$)。结论: AS患者外周血Treg、Th17细胞数量的改变, 与AS的发生、发展有明显相关性, 检测AS患者外周血Treg、Th17细胞的数量以及Th17/Treg的比率有助于AS病情的判断。

[关键词] 辅助性T细胞17; 调节性T细胞; 脊柱炎, 强直性; 免疫, 细胞; 自身免疫疾病

[中图分类号] R446.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)01-0068-04

A Study on the Clinical Value and Correlation of Treg and Th17 Cells among Different Active Stages of Ankylosing Spondylitis

WANG Zuolong¹, ZHONG Naifeng², MA Li¹

(1. Central Laboratory, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Biotechnology, School of Medical Bioengineering of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical significance and correlation of T helper cells 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in different stages of patients with ankylosing spondylitis (AS). **Methods:** A total of 78 peripheral blood samples were taken from AS patients, the AS group was divided into low-activity AS group and high-activity AS group, 30 healthy peripheral blood samples serves as control group. Th17 and Treg numbers were detected by flow cytometry (FCM) and intracellular cytokine staining technique (ICS) to study the relationship between Treg, Th17 cells and AS activity. **Results:** Compared with the control group, the percentage of Treg cells in AS group and low-activity AS group had no significant difference ($P > 0.05$), high-activity AS group peripheral blood Treg cells were significantly reduced ($P < 0.01$). The percentage of Th17 cells in AS group increased ($P < 0.01$), peripheral blood Th17 percentage of low-activity AS group and high-activity AS group were in-

* [基金项目] 贵州省科技厅社会发展攻关项目[黔科合 LG 字(2011)034 号]

** 通信作者 E-mail: 18608505639@163.com

网络出版时间: 2015-01-13 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150113.1835.008.html>

creased ($P < 0.05$), and the ratios of Th17/Treg in AS group, low-activity AS group and high-activity AS group were increased ($P < 0.01$). The ratio of Treg cells of high-activity AS group was significantly lower than that of low-activity AS group ($P < 0.01$); the ratio of Th17 cell of high-activity AS group was significantly higher than that of low-activity AS group ($P < 0.01$); the ratio of peripheral blood Th17/Treg cell of high-activity AS group was significantly higher than that of low-activity AS group ($P < 0.01$). There were positive correlation of Bath ankylosing spondylitis disease activity index (BASDI) with peripheral blood Th17 cell ratio and Th17/Treg ratio of AS patients, negative correlation between BASDI and Treg cells ratio of AS patients ($P < 0.05$). **Conclusions:** Changes of the amount of Treg and Th17 cells is related to the occurrence and development of AS. The amount of Treg and Th17 and the ratio of Th17/Treg can contribute to diagnose AS patient condition and serve as the treatment target of AS.

[**Key words**] T helper cells 17; regulatory T cells; spondylitis, ankylosing; immunity, cellular; autoimmune diseases

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种慢性自身免疫性疾病,其准确的发病机理目前尚未可知^[1]。病因有遗传假说、DNA 甲基化、细菌感染假说、免疫假说,未折叠蛋白反应假说等^[2-3]。有文献报道在 AS 的发生和发展中,T 细胞亚群失衡起到了关键作用^[4]。按照 CD4⁺ T 细胞分化和功能性将其分为辅助性 T 细胞 17(Th17)及发挥负调节功能的 T 细胞(regulatory T cells, Treg)等亚群。有研究发现 AS 患者外周血 Th17 细胞明显增高而 Treg 细胞降低,本研究通过检测 AS 患者外周血中 Treg、Th17 及其 Th17/Treg 比率,分析其与 AS 活动性的相关性,为 AS 的临床诊断及治疗提供新思路和新方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

78 例 AS 患者作为研究组,30 例健康体检者作为对照组。AS 患者中男性 65 例,女性 13 例,年龄 17~53 岁,平均(26 ± 7.8)岁;患者均为 HLA-B27 阳性,均符合 1984 年纽约修订的 AS 的诊断标准,均未经任何治疗。排除标准:就诊前 6 个月内未用过糖皮质激素,排除合并其他与 AS 相关的疾病(肝硬化、肿瘤等),无风湿病及其他自身免疫病。抽血前,所有 AS 受试者均自愿签署知情同意书,填写病例调查表以及 Bath AS 功能指数(BASFI)、Bath AS 病情活动指数(BASDAI)表格。依据 Bath AS 病情活动指数,将 AS 组分为低活动性 AS 组(BASDI < 4 分,44 例)、高活动性 AS 组(BASDI ≥ 4 分,34 例)。两组患者年龄及性别构成差异无

统计学意义($P > 0.815$)。30 名健康体检者中男性 16 名、女性 14 名,年龄 15~52 岁,平均(25 ± 8)岁,无 HIV 感染,无重大疾病史。对照组与 AS 组年龄及性别构成差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 受检者均于早上 8~10 时空腹抽取静脉血 2~3 mL 于 EDTA-K2 抗凝管中,2 h 内检测 Th17、Treg 细胞。

1.2.2 细胞体外刺激活化 取上述经 EDTA-K2 抗凝的静脉血,用淋巴细胞液分离密度梯度离心法获取单个核细胞,RPMI 1 640 调整细胞浓度至 2×10^6 /mL,接种于 6 孔培养板,加入莫能霉素,使最终浓度分别为 1.7 g/L,加入离子霉素,使最终浓度分别为 1 g/L,加入佛波酯,使最终浓度分别为 0.05 g/L。再进行 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱培养 5 h。以上所用试剂均购自美国 BD 公司。

1.2.3 CD 69 检测 通过检测 CD3⁺CD8⁻ T 淋巴细胞膜表面的 CD 69 表达,以衡量激活效果。当 CD 69 表达 > 90% (图 1) 方可进行 Th17 细胞的检测。

1.2.4 Th17 细胞检测 取 2 支试管,标记为同型管及阳性管,并分别加入 CD3-FITC、CD8-PECy7 抗体各 20 μ L,然后加入已刺激培养 5 h 的全血 50 μ L,混匀,室温避光孵育 15 min;加入溶血素 800 μ L,混匀避光溶血 3 min,再转入 37 °C 水浴箱中孵育 5 min,加入 PBS 1 mL,混匀后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次。加入破膜剂 1 mL,混匀,45 min 破膜,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,对应加入抗体标记的同型对照(-)、Th17(+),混匀,室温避光孵育 15 min;加入 PBS 缓冲

液 1 mL,充分混匀,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次;弃上清液,加入适量 PBS 充分混匀,上机检测。Th17 细胞的结果分别以 $CD3^+CD8^-IL-17^+$ 细胞的百分率表示。

1.2.5 Treg 细胞检测 取 2 支试管,第 1 管做同型对照并加入 IgG1-APC、IgG2a-Alexflour672 抗体 20 μ L,第 2 管加入 Treg Cocktail (CD4-FITC、CD25-APC、CD127-Alexflour672) 20 μ L,再分别加入 EDTA-K2 抗凝外周血 50 μ L,漩涡混合器充分混匀,室温避光孵育 15 min,加入 800 μ L 溶血素,充分混匀,避光溶血 3 min,再转入 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中 5 min,加入 PBS 缓冲液 1 mL,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复一次,弃上清液,加入适量 PBS 充分混匀,上机检测。Treg 细胞的结果以 $CD4^+CD127^{low}CD25^+$ 细胞的百分率表示。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。各组检测指标数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。组间比较采用 t 检验分析;两变量之间的相关性分析采用 Pearson 相关分析方法, $r > 0.7$ 为存在高度相关, $0.4 \leq r < 0.7$ 为中度相关, $r < 0.4$ 为低度相关。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Th17、Treg 细胞

与对照组相比,AS 组和低活动性 AS 组外周血 Treg 细胞百分率均无显著差异($P > 0.05$),高活动性 AS 组外周血 Treg 细胞百分率明显降低($P < 0.01$),差异有统计学意义,AS 组外周血 Th17 细胞百分率增高($P < 0.01$),差异有统计学意义,且低活动性 AS 组和高活动性 AS 组外周血 Th17 细胞百分率均增高($P < 0.05$),差异有统计学意义,AS 组、低活动性 AS 组、高活动性 AS 组外周血 Th17/Treg 的细胞比值均增高($P < 0.01$),差异有统计学意义;与低活动性 AS 组相比,高活动性 AS 组外周血 Treg 细胞百分率明显降低($P < 0.01$),差异有统计学意义,高活动性 AS 组外周血 Th17 细胞百分率明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$),高活动性 AS 组外周血 Th17/Treg 的细胞比值明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1、图 2。

2.2 Th17、Treg 细胞与 AS 活动性的相关性

AS 患者外周血 Th17 细胞比例及 Th17/Treg 与 Bath 强直性脊柱炎病情活动指数(BASDI)呈正

相关($r = 0.409, r = 0.459, P < 0.01$);Treg 细胞比例与 BASDI 呈负相关($r = -0.265, P < 0.05$)。

表 1 AS 组及正常对照组外周血中 Treg、Th17 细胞

Tab.1 Peripheral blood Treg and Th17 cell ratios of the AS group and normal control

组别	n	Th17 细胞(%)	Th17/Treg	Treg 细胞(%)
正常对照组	30	0.82 ± 0.35	0.11 ± 0.05	8.16 ± 2.16
AS 组	78	$1.57 \pm 0.78^{(1)}$	$0.22 \pm 0.13^{(1)}$	7.59 ± 1.97
低活动性	44	$1.26 \pm 0.5^{(1)}$	$0.16 \pm 0.08^{(1)}$	8.18 ± 2.08
高活动性	34	$2.00 \pm 0.86^{(1)(2)}$	$0.31 \pm 0.13^{(1)(2)}$	$6.62 \pm 1.35^{(1)(2)}$

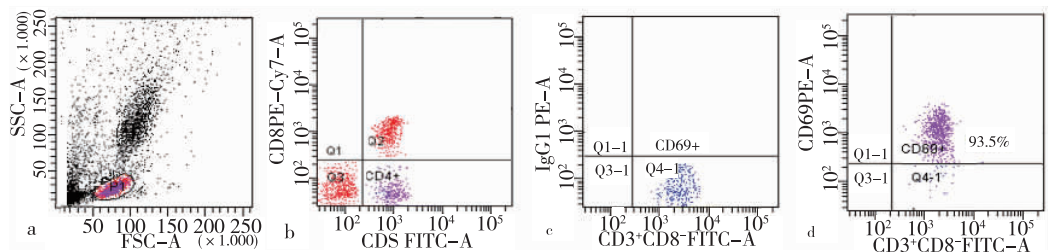
⁽¹⁾与正常对照组比较, $P < 0.01$;⁽²⁾与低活动性 AS 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

AS 是一种严重的慢性炎性自身免疫性疾病,对患者的工作和生活造成了严重影响,同时也给患者的家庭和社会带来了沉重的负担,多发于男性青壮年,发病的高峰年龄为 20~30 岁。

$CD4^+CD25^+$ 调节性 Treg 细胞在胸腺中分化和成熟,是一组具有免疫调节作用的细胞群^[1]。通过细胞接触依赖机制或抑制性细胞因子依赖机制,主动抑制自身免疫性 T 淋巴细胞的活化,维持自身免疫耐受,防止自身免疫性疾病的发生。王朋等^[5]发现 AS 患者 Treg 细胞上调,Crispin 等^[6]研究结果恰好与之相反。本研究结果显示,AS 患者外周血 Treg 细胞低于健康对照组,与 Crispin 等的结论相符。

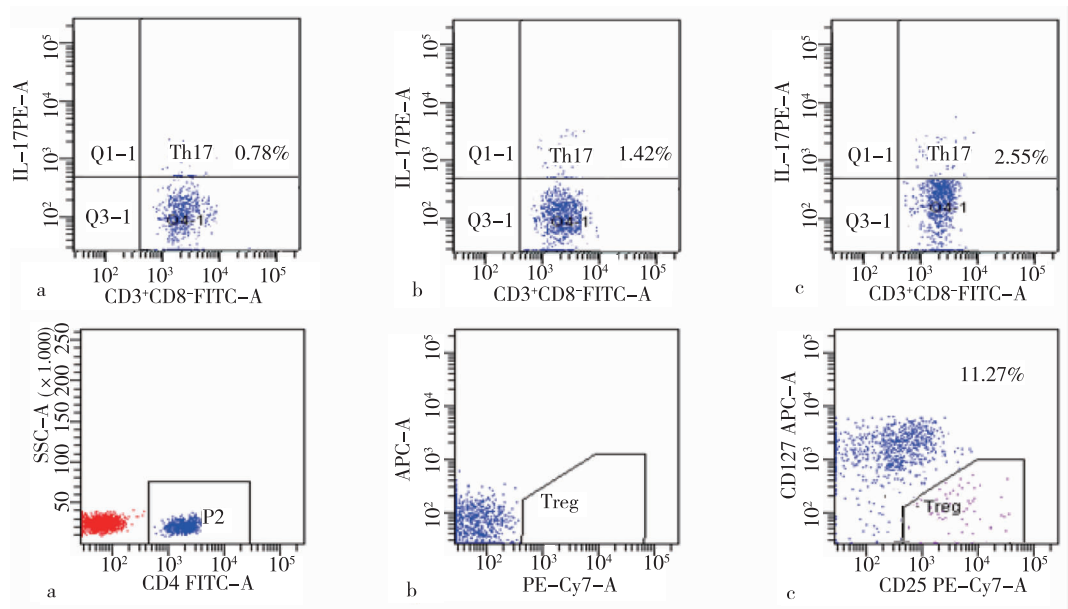
Th17 细胞具有分化白细胞介素(interleukin, IL)23 依赖性,产生 IL-17,而不产生 γ -干扰素为特征的 T 细胞亚群,通过分泌促炎细胞因子 IL-17,确保中性粒细胞分化、成熟和活化,刺激单核细胞和成纤维细胞活化来参与 AS 炎症反应^[7]。本研究中 AS 患者外周血 Th17 细胞与 AS 活动性呈正相关($P < 0.01$),但低活动性 AS 组外周血 Th17 细胞增高并不明显,高活动性 AS 组外周血 Th17 细胞明显增高,提示 Th17 细胞主要介导 AS 活动期的炎症反应,并参与疾病的进展。本研究还发现 Th17/Treg 失衡与 Th17 数量增加优势及 Treg 细胞数量减少有关,与 LangrishCL 等结论一致^[1]。进一步研究显示,外周血 Treg 细胞的这种减低在 AS 低活动性组无统计学意义,但在 AS 高活动性组存在显著差异,提示 AS 疾病早期 Treg 细胞仍能正常行使反馈功能,抑制炎症反应,随疾病活动性增强



注:a 为淋巴细胞收集图,b 为 $CD3^+CD8^-$ 的细胞,c 为 $CD3^+CD8^-CD69^-$ 细胞,d 为 $CD3^+CD8^-CD69^+$ 细胞

图 1 流式细胞术检测 $CD3^+CD8^-CD69^+$ 细胞 (CD69 细胞) 设门分析方法

Fig. 1 determination of $CD3 + CD8 - CD69 +$ cells (CD69cells) with flow cytometry



注:a 为正常对照,b 为低活动性 AS,c 为高活动性 AS

图 2 Th17 和 Treg 细胞百分率 (流式细胞术)

Fig. 2 The percentage of Th17 and Treg cells

优势促炎细胞因子的作用下,如 IL-6,刺激了 Th17 细胞分化,抑制了 Treg 细胞的分化^[8]。本研究中,AS 患者 Treg 细胞与 AS 活动性呈负相关,检测 AS 患者外周血 Treg 细胞可作为判断 AS 疾病活动性的参考指标。但单独比较 Th17 细胞或 Treg 细胞与疾病活动性的相关性不及 Th17/Treg 细胞比率,联合检测 Th17、Treg 细胞,比较 Th17/Treg 细胞的失衡对研究 AS 疾病活动监测意义更大。

Th17、Treg 细胞在人体复杂的免疫调节中起到重要作用,纠正细胞失衡、调节其功能是治疗 AS 的可能策略,能达到诱导病情缓解、减轻关节炎症反应的作用^[9]。Th 细胞功能失衡进而导致 AS 的发生、发展,故可通过检测 Th17、Treg 细胞及 Th17/Treg 比例,监测 AS 患者的治疗及疾病活动情况。

综上所述,AS 患者存在 Th17、Treg 细胞的失

衡,随着 AS 疾病活动度的增高,患者体内 Th17 细胞介导的细胞免疫功能亢进,而 Treg 细胞介导的免疫抑制作用减弱,联合检测 AS 患者外周血 Th17、Treg 细胞有助于 AS 病程监测,对 AS 临床治疗有重要意义。因此,Th17、Treg 细胞及 Th17/Treg 比例有望成为临床判断 AS 病情的有效指标,可能为 AS 诊疗提供新思路。

4 参考文献

[1] DiCarlo EF, Kahn LB. Inflammatory diseases of the bones and joints[J]. Semin Diagn Pathol, 2011(1):53-64.
[2] Díaz-Peña R, López-Vázquez A, López-Larrea C. Old and new HLA associations with ankylosing spondylitis[J]. Tissue Antigens, 2012(3):205-213.

(下转第 75 页)

本次调查还发现,与中国 CAP 指南用药标准^[1]比较,指南 1 组一代头孢使用过少,倾向于使用 β 内酰胺类酶抑制剂及头霉素类,应引起重视,需加强抗菌药物管理。指南 2 组患者头霉素类使用频率高,考虑患者年龄大,多有基础疾病,因此头霉素类使用合理。指南 3 组倾向于选择 β 内酰胺类酶抑制剂及阿奇霉素联合用药,基本合理。本次资料 280 例 CAP 患者中入院后均进行痰培养,执行指南情况较好,但痰培养的阳性率低,未检出肺炎链球菌、非典型病原体(支原体、衣原体、军团菌等)。分析原因可能与 CAP 患者入院前在家中、门诊或社区医院应用过 β 内酰胺类抗菌药物有关。也可能是肺炎链球菌为苛氧菌,对留取标本及实验室要求较高,有出现假阴性可能^[13]。

综上,本次研究发现贵阳地区 CAP 患者初始治疗时存在部分抗菌药物选择不合理,这要求临床医生治疗 CAP 患者选择抗菌药物时,应对 CAP 患者入院前应用的抗菌药物进行评价,严格按照“指南”,根据患者严重程度分级进行抗菌治疗,减少抗菌药物的不合理应用。

4 参考文献

- [1] 中华医学会呼吸病学分会. 社区获得性肺炎诊断和治疗指南[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006(10):651-655.
- [2] Arnold FW, Ramirez JA, McDonald LC, et al. Hospitalization for community-acquired pneumonia severity index vs clinical judgment[J]. Chest, 2003(124):121-124.
- [3] Kung HC, Hoyert DL, Xu J, et al. Deaths; final data for 2005[J]. Natl Vital Stat Rep, 2008(56):1-120.
- [4] File TM. The science of selecting antimicrobials for community-acquired pneumonia (CAP) [J]. J Manag Care Pharm, Mar, 2009(2):5-11.
- [5] 张洁. 克林霉素的不良反应[J]. 药物不良反应杂志, 2004(5):317-319.
- [6] 江忠亚, 靳玉香. 盐酸莫西沙星治疗呼吸道感染 40 例临床分析[J]. 中国现代实用医学杂志, 2007(11):10-11.
- [7] 陈勇. 莫西沙星药理特性与用药安全性研究进展及分析[J]. 中国医药指南, 2011(21):186-187.
- [8] 孙彦, 黎小妍, 彭丽梅. 喹诺酮类药物治疗社区获得性肺炎疗效观察与安全性评价[J]. 热带医学杂志, 2011(4):456-459.
- [9] 刘又宁, 陈民钧, 赵铁梅, 等. 中国城市成人社区获得性肺炎 665 例病原学多中心调查[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006(29):3-8.
- [10] Rzesutek M, Wierzbowski A, Hoban DJ, et al. A review of clinical failures associated with macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004(2):95-104.
- [11] Waterer G, Somes GW, Wunderink RG. Monotherapy may be suboptimal for severe bacteremic pneumococcal pneumonia [J]. Arch Intern Med, 2001(15):1837-1842.
- [12] Martinez JA, Horcajada JP, Almela M, et al. Addition of a macrolide to β -lactam based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia [J]. Clin Infect Dis, 2003(4):389-395.
- [13] 尹红军, 王浩天, 刘远, 等. 社区获得性肺炎 160 例初始治疗回顾性分析[J]. 临床误诊误治, 2013(5):9-11.
(2014-06-28 收稿, 2014-07-31 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 刘 华

(上接第 71 页)

- [3] Onuora SL. Spondyloarthritis: Evidence from animal studies supports the 'enthesal stress' hypothesis of ankylosing spondylitis. [J]. Nat Rev Rheumatol, 2012(8):248.
- [4] Taylan A, Sari I, Akinçi B, et al. Biomarkers and cytokines of bone turnover: extensive evaluation in a cohort of patients with ankylosing spondylitis [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2012(12):1471-1474.
- [5] 王朋. HLA-B27 阳性者中 CD4⁺CD25^{bright}Treg 细胞的检测及意义[J]. 实验与检验医学, 2010(28):579-580.
- [6] 李冬梅, 李向培, 等. 强直性脊柱炎患者外周血 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}-T 细胞检测及其意义[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2008(4):266-271.
- [7] Cardiel MH, Londoño JD, Gutiérrez E, et al. Translation, cross-cultural adaptation, and validation of the Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI), the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) and the Dougados Functional Index (DFI) in a Spanish speaking population with spondyloarthropathies. [J] Clin Exp Rheumatol, 2003(4):451.
- [8] Takavallagi II. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems [J]. Nat Rev Immunol, 2007(4):292-304.
- [9] Prevosto C, Goodall JC, Hill Gaston JS. Cytokine secretion by pathogen recognition receptor-stimulated dendritic cells in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis [J]. J Rheumatol, 2012(10):1918-1928.
(2014-09-29 收稿, 2014-11-03 修回)
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 赵 毅