

强直性脊柱炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群的表达

杨荣助¹, 宋建新² (1. 云南省瑞丽市民族医院检验科 678600; 2. 云南省第一人民医院检验科, 昆明 650032)

【摘要】 目的 探讨强直性脊柱炎(AS)患者外周血 CD4⁺CD45RA⁺、CD4⁺CD45RO⁺、CD8⁺CD45RA⁺ 和 CD8⁺CD45RO⁺ T 淋巴细胞亚群的表达及与免疫功能的关系。**方法** 用流式细胞仪检测 55 例 AS 患者(分 AS 病情活动组 30 例、稳定组 25 例)CD4⁺、CD8⁺ 细胞 CD45RO、CD45RA 的表达,并与健康对照组进行比较。**结果** AS 患者活动期 CD4⁺CD45RO⁺、CD8⁺CD45RO⁺ T 淋巴细胞表达明显高于健康对照组($P < 0.01$),CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁺ 明显对低于健康对照组($P < 0.01$);稳定期 CD4⁺CD45RO⁺、CD8⁺CD45RO⁺ 与活动期比较明显降低($P < 0.05$),但仍高于健康对照组($P < 0.05$);CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁺ 与活动期相比明显升高($P < 0.05$),但仍低于健康对照组($P < 0.05$)。**结论** CD4⁺CD45RO⁺、CD8⁺CD45RO⁺ 和 CD4⁺CD45RA⁺、CD8⁺CD45RA⁺ T 淋巴细胞的异常表达是导致强直性脊柱炎患者机体免疫功能失去平衡的重要原因。

【关键词】 强直性脊柱炎; T 淋巴细胞; 流式细胞术

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2013.16.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2013)16-2102-02

The expression of T lymphocyte subgroup in peripheral blood of ankylosing spondylitis patients YANG Rong-zhu¹, SONG Jian-xin² (1. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Ruili, Ruili, Yunnan 678600; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

【Abstract】 Objective To discuss on the peripheral blood CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RA⁺ and CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocyte subgroup expression and immune function in patients with ankylosing spondylitis (AS). **Methods** To detect the expression of CD45RO and CD45RA in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte by flow cytometry in patients and compared with the healthy control group. **Results** Compare with healthy control group, the expressions of CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocyte in patients active stage was significantly increased ($P < 0.01$), but the expression of CD4⁺CD45RA⁺ and CD8⁺CD45RA⁺ decreased obviously ($P < 0.01$). The expressions of CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocyte in patients stable stage was significantly lower than that in patients active stage ($P < 0.05$), but which was still higher than that in healthy control group ($P < 0.05$). The expression of CD4⁺CD45RA⁺ and CD8⁺CD45RA⁺ T lymphocyte in patients stable stage was significantly higher than that in patients active stage ($P < 0.05$), but which was still lower than that in healthy control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The abnormal expressions of CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RO⁺ and CD4⁺CD45RA⁺, CD8⁺CD45RA⁺ T lymphocyte was one of the important reason for patients immune dysfunction with ankylosing spondylitis.

【Key words】 ankylosing spondylitis; T lymphocyte; flow cytometry

强直性脊柱炎(AS)是一种进行性发展以脊柱关节和骶髋关节慢性炎症为主要表现的自身免疫性疾病,其病因及发病机制至今仍不清楚。CD45RA、CD45RO 作为人 CD45 的重要亚型,很早就被用作区分初始和记忆 T 淋巴细胞的标识,在免疫应答和自身免疫等方面具有重要意义^[1]。本研究应用流式细胞技术,检测 AS 患者活动期及稳定期外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞 CD45RO、CD45RA 亚群的变化,以探讨 AS 患者免疫功能变化特点。

1 材料与方法

1.1 一般资料 选择 2009 年 5 月至 2012 年 11 月云南省第一人民医院风湿免疫科收治的 AS 患者 55 例,男 42 例,女 13 例,年龄 12~52 岁;其中活动期 30 例,稳定期 25 例,诊断均符合 1984 年修订的强直性脊柱炎纽约分类标准^[2]。活动指标为:红细胞沉降率(ESR) > 25 mm/h,有脊背痛,晨僵不小于 30 min,伴周围关节肿痛, Bath 强直性脊柱炎活动性指数(BASDAI) ≥ 4 。健康对照组为来云南省第一人民医院体检的健康体检者,共 35 例,年龄 14~49 岁,无 AS 既往史和家族史,排除其他自身免疫性疾病和感染性疾病表现。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂与仪器 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗

CD45RA 单抗、藻红蛋白(PE)标记的抗 CD45RO 单抗和藻红蛋白-菁蓝色素荧光素(PE-Cy5)标记的抗 CD4、CD8 单抗,以上试剂均由法国 Immunotech 公司,流式细胞仪为 COULTER EPICS-XL。

1.2.2 标本处理 于清晨空腹分别采集 AS 活动期、稳定期及对照组的空腹静脉血 1.0 mL,肝素抗凝 4 h 内检测。取 100 μ L 抗凝血,加入 CD4-PE-Cy5(或 CD8-PE-Cy5)、CD45RO-PE、CD45RA-FITC 单抗各 20 μ L,混匀,室温避光孵育 30 min,经 Q-Prep 处理后,用 3.0 mL 冷 PBS 洗涤细胞一次,弃上清液,加入 1.0 mL 冷 PBS 重悬细胞后用流式细胞仪检测,结果用百分率表示。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 12.0 统计软件包进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析对 3 组均数进行统计分析,并用 q 检验进行各组均数间的两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 患者活动期 CD4⁺CD45RO⁺ T 淋巴细胞明显高于健康对照组 ($P < 0.01$),CD4⁺CD45RA⁺ 明显低于健康对照组 ($P < 0.01$),CD45RO⁺/CD45RA⁺ 明显增高 ($P < 0.01$);稳定期 CD4⁺CD45RO⁺ 与活动期比较明显降低 ($P < 0.05$),但仍高

于健康对照组($P<0.05$); $CD4^{+}CD45RA^{+}$ 与活动期相比明显升高($P<0.05$),但仍低于健康对照组($P<0.05$)。见表 1。

表 1 AS 患者活动期、稳定期及对照组淋巴 T 细胞表达($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	CD4 ⁺	CD4 ⁺	CD45RO ⁺ /
		CD45RO ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
活动期	30	69.87±8.10 ^a	18.74±6.32 ^a	17.07±2.30 ^a
稳定期	25	47.28±3.96 ^{bc}	26.52±3.62 ^{bc}	10.52±1.81 ^{bc}
健康对照组	35	34.02±3.37	37.96±4.02	5.28±1.24

注:与健康对照组相比,^a $P<0.01$;与健康对照组相比,^b $P<0.05$;与活动期相比,^c $P<0.05$ 。

2.2 AS 患者活动期 $CD8^{+}CD45RO^{+}$ T 淋巴细胞明显高于健康对照组($P<0.01$), $CD8^{+}CD45RA^{+}$ 明显对低于健康对照组($P<0.01$), $CD45RO^{+}/CD45RA^{+}$ 明显增高($P<0.01$);稳定期 $CD8^{+}CD45RO^{+}$ 与活动期比较明显降低($P<0.05$),但仍高于健康正常对照组($P<0.05$); $CD8^{+}CD45RA^{+}$ 与活动期相比明显升高($P<0.05$),但仍低于健康对照组($P<0.05$)。见表 2。

表 2 AS 患者活动期、稳定期及对照组淋巴 T 细胞表达($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	n	CD8 ⁺	CD8 ⁺	CD45RO ⁺ /
		CD45RO ⁺	CD45RA ⁺	CD45RA ⁺
活动期	30	19.14±2.15 ^a	7.38±1.52 ^a	6.69±1.27 ^a
稳定期	25	13.57±1.97 ^{bc}	13.04±1.77 ^{bc}	3.65±0.47 ^{bc}
健康对照组	30	5.97±1.01	19.62±2.02	1.61±0.26

注:与健康对照组相比,^a $P<0.01$;与健康对照组相比,^b $P<0.05$;与活动期相比,^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

$CD45RO^{+}$ T 细胞表现为记忆细胞的特点,具有辅助诱导作用;而 $CD45RA^{+}$ T 细胞却表现为初始 T 细胞的特点,具有抑制免疫的作用^[4]。 $CD4^{+}CD45RA^{+}$ T 细胞接触抗原活化后可转变为 $CD4^{+}CD45RO^{+}$ T 细胞。 $CD4^{+}CD45RO^{+}$ T 细胞再次被抗原激活后迅速增殖,辅助 B 细胞合成 IgG,而 $CD4^{+}CD45RA^{+}$ T 细胞对抗原刺激反应较弱。尽管两类细胞的表型可以发生转换,但分泌细胞因子功能的差异并没有改变。通常 $CD45RO^{+}$ T 细胞能产生多种细胞因子(IL-2、IL-4 或 IFN- γ), $CD45RA^{+}$ T 细胞以分泌 IL-2 为主^[5]。

在自身免疫病的发病过程中,记忆 T 辅助细胞($CD4^{+}CD45RO^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RO^{+}$)与初始 T 细胞($CD4^{+}CD45RA^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RA^{+}$)起不同的作用。记忆 T 辅助细胞遇抗原刺激后以产生效应分子为主,如细胞因子,辅助 B 细胞产生抗体;初始 T 细胞遇抗原刺激后以活化增殖反应为主,同时其表面表达的 CD45RA 也逐渐转变为 CD45RO,从而进一步增强免疫反应。在 SLE 患者的研究中发现, $CD4^{+}CD45RA^{+}$ T 细胞在活动期下降,而在稳定期上升^[6-7], $CD8^{+}CD45RO^{+}$ T 细胞则在活动期增高,稳定期降至正常。在类风湿关节炎也观察到 $CD4^{+}CD45RO^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RO^{+}$ T 淋巴细胞阳性率均明显增高^[8-9]。这些研究说明 CD45RO 作为体内记忆性 T 细胞的标志,在体内的免疫反应中逐渐增多,一旦有抗原的刺激,则可以迅速发挥其生物功能,在疾病中则表现为疾病的发生与发展。

本试验结果显示,AS 患者外周血, $CD4^{+}CD45RO^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RO^{+}$ T 细胞表达明显高于健康者, $CD4^{+}CD45RA^{+}$

$CD8^{+}CD45RA^{+}$ T 细胞表达明显降低;而且活动期 $CD4^{+}CD45RO^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RO^{+}$ T 细胞明显高于稳定期; $CD4^{+}CD45RA^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RA^{+}$ T 细胞明显降低。说明在 AS 患者中,由于受到某些抗原的刺激,CD45RA 逐渐转变为 CD45RO,这些细胞在 AS 炎症部位大量集聚,导致疾病的发生。AS 患者 $CD45RO$ 、 $CD45RA$ 双阳性细胞显著增高,也表明患者体内部分初始 T 辅助细胞正处于向记忆 T 辅助细胞转化的过程中。由于 AS 患者体内 $CD45RA^{+}$ T 数量减少,导致诱导免疫耐受功能减低,抑制反应水平低下;而 AS 活动期患者由于体内具有诱导免疫耐受功能的 $CD45RA^{+}$ T 细胞持续减少,不能诱导活化效应 T 细胞产生耐受。活化的效应 T 细胞分泌 IFN- γ 、TNF- α 等细胞因子,活化巨噬细胞,结合和刺激系统分子表达增加,发挥免疫杀伤作用,增强局部的炎性病变,导致关节的损伤加重。在疾病的稳定期,虽 $CD4^{+}CD45RA^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RA^{+}$ T 细胞逐渐上升,但与健康对照组比较仍有统计学差异,说明 AS 患者细胞免疫和免疫调节功能均受损,而 $CD45RA^{+}$ 、 $CD45RO^{+}$ T 辅助细胞的减少是导致机体免疫功能失去平衡的重要原因。

总之,本研究表明 AS 患者外周血 $CD4^{+}CD45RO^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RO^{+}$ 和 $CD4^{+}CD45RA^{+}$ 、 $CD8^{+}CD45RA^{+}$ T 淋巴细胞的异常表达是导致机体免疫功能失去平衡的重要原因,并与 AS 疾病活动相关,参与 AS 发病和进展。

参考文献

[1] 王昭军,周建生. CD45RA/CD45RO 临床研究进展[J]. 解剖与临床,2010,15(3):210-212.

[2] Calin A. diagnostic criteria for ankylosing spondylitis; A proposal for modification of the New York criteria[J]. Arthritis Rheum,1985,28(3):357-359.

[3] 武建国,李晓军. 免疫学词典[M]. 南京:南京师范大学出版社,2001:20.

[4] Mcbreen S, Imlach S, Shirafuji T, et al. Infection of the $CD45RA^{+}$ (naive) subset of peripheral $CD8^{+}$ lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 in vivo[J]. J Virol,2001,75(9):4091-4102.

[5] Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, et al. Mycoplasma pneumoniae induces chronic respiratory infection, airway hyperreactivity, and pulmonary inflammation; a murine model of infection-associated chronic reactive airway disease[J]. Infect Immun,2002,70(2):649-654.

[6] 梁再斌,张士发,许静,等. 系统性红斑狼疮患者外周血 T 细胞亚群的检测[J]. 中国麻风皮肤病杂志,2003,19(6):567-568.

[7] 王卫文,李有武,夏永祥,等. 系统性红斑狼疮患者外周血 $CD8^{+}CD(25)^{+}$ T 细胞亚群改变的初步研究[J]. 医学理论与实践,2012,25(21):2593-2595.

[8] 谭有为,胡守锋,史兵伟. 类风湿性关节炎患者 IL-17 和淋巴细胞 CD45RO 表达的临床意义[J]. 蚌埠蚌埠学院学报,2008,33(5):608-609.

[6] 于乐,顾美华. Th22 细胞与类风湿性关节炎的关系[J]. 现代免疫学,2013,33(1):81-83.