

外周血 T 细胞亚群及 IL-17、IL-10 在原发性干燥综合征的表达^{*}

牛广华, 张艺凡, 高玉洁[△], 严 峰(辽宁中医药大学附属医院临床检验中心, 沈阳 110032)

【摘要】 目的 研究外周血 T 细胞亚群及 IL-17、IL-10 在原发性干燥综合征(pSS)患者中的表达。**方法** 选取该院风湿科门诊或住院诊断的 pSS 患者 89 例, 健康对照组选自该院健康体检者 38 例, 用流式细胞仪检测外周血 T 细胞亚群及 ELISA 检验血清中的 IL-17、IL-10 表达水平。**结果** 外周血 T 细胞亚群检测结果显示, pSS 患者 CD3⁺ 与健康人比较差异无统计学意义($P>0.05$); CD4⁺ 较健康人明显下降($P<0.05$); CD8⁺ 较健康人极明显升高($P<0.05$); CD4⁺/CD8⁺ 较健康人极明显下降($P<0.05$); 细胞因子检测结果显示, IL-17 水平较健康人明显升高($P<0.05$); IL-10 水平较健康人极明显降低($P<0.05$)。**结论** pSS 患者较健康人存在明显的 T 细胞免疫异常, 患者自身存在炎症反应及缺乏对炎症反应的抑制功能。

【关键词】 原发性干燥综合征; T 细胞亚群; 白细胞介素-17; 白细胞介素-10

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)18-2664-02

Expression of peripheral blood T-lymphocyte subsets, IL-17 and IL-10 in primary Sjogren's syndrome^{*} NIU Guang-hua, ZHANG Yi-fan, GAO Yu-jie[△], YAN Feng (Clinical Laboratory Center, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China)

【Abstract】 Objective The research the expression of peripheral blood T-lymphocyte subsets, IL-17 and IL-10 in primary Sjogren's Syndrome(pSS). **Methods** 89 patients with pSS diagnosed in the outpatient department of rheumatic disease or the inpatient department of our hospital were selected. And 38 healthy persons undergoing the physical examination were selected as the control group. T-lymphocyte subsets were identified and classified by the flow cytometer. The expression levels of IL-17 and IL-10 in serum were detected by ELISA. **Results** The results of peripheral blood T-lymphocyte subsets showed that CD3⁺ had no statistical differences between healthy people and pSS patients($P>0.05$), the CD4⁺ level in the pSS patients was obviously lower than that in the normal persons($P<0.05$), while CD8⁺ was extremely increased compared with the normal healthy persons($P<0.05$) and CD4⁺/CD8⁺ was extremely decreased compared with the normal healthy persons($P<0.05$). The results of cytokines showed that the level of IL-17 was significantly increased compared with the healthy persons($P<0.05$) and the IL-10 level extremely decreased compared with the normal healthy persons($P<0.05$). **Conclusion** Compared with the healthy persons, the obvious immune abnormality of T-lymphocyte exists in the pSS patients, the patients themselves exist the inflammatory reaction and lack the inhibitory ability to inflammatory reaction.

【Key words】 primary Sjogren's syndrome; T-lymphocyte subsets; interleukin-17; interleukin-10

干燥综合征又名舍格伦综合征(SS), 是一个主要侵犯外分泌腺体, 表现以口干、咽干等症状为特征的自身免疫性疾病。本病可分为原发性干燥综合征(pSS)和继发性干燥综合征(sSS)两种。pSS在我国人群患病率为0.3%~0.7%, 目前其确切的发病机制尚不清楚, 其中细胞免疫学机制是研究的热点^[1]。白细胞介素(IL)-17主要由近期新发现的CD4⁺T细胞亚群Th17细胞分泌, 已知Th17细胞主要分泌IL-17A、IL-17F和IL-6、IL-21、IL-22、TNF- α 等多种细胞因子。IL-17作为目前新发现的细胞因子, 可以促进白细胞的迁移和活化, 从而加重炎症反应。一些研究显示, Th17细胞与干燥综合征、类风湿关节炎、银屑病、炎症肠病等疾病的发病有关^[2-4]。IL-10是一种抑制性细胞因子, 由Treg细胞——目前已知的具有抗炎作用的CD4⁺T细胞亚群产生, IL-10在移植免疫及微生物感染中起着重要的抑制作用。本文旨在研究IL-17、IL-10、T淋巴细胞亚群在pSS中的表达情况, 以进一步探讨pSS的发病机

制, 为其提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 按照2002年修订的干燥综合征国际诊断(分类)标准^[5], 选择2013年8月至2014年8月于辽宁中医附属医院风湿科门诊或住院诊断的pSS患者89例, 其中女80例, 男9例; 年龄22~68岁, 平均(51.05 $\pm$ 12.23)岁; 病程最短3个月, 最长11年, 平均(5.3 $\pm$ 2.16)年。健康对照组选自本院女性健康体检者38例, 年龄30~72岁, 平均为(55.30 $\pm$ 13.33)岁。除去试验前接受有关药物治疗(如激素或免疫抑制剂)的患者。

1.2 仪器与试剂 仪器采用美国BD公司BD FACSCalibur全自动流式细胞仪; 美国BIORAD680酶标仪。外周血T细胞亚群分析试剂盒, 美国BD Bioscience生产, 批号90885; IL-17酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒, 武汉优尔生科技股份有限公司, 批号L140218305; IL-10 ELISA检测试剂盒, 武汉优

^{*} 基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(2014020049)。

作者简介: 牛广华, 男, 博士, 主任技师, 从事临床免疫学、自身免疫疾病的研究。 [△] 通讯作者: E-mail: jie_54@sohu.com。

尔生科技股份有限公司,批号 L140218300。

1.3 方法

1.3.1 外周血标本采集 晨空腹取静脉血 3 mL 于 EDTA-K₂ 真空抗凝采血管中,用于检测外周血 T 细胞亚群;同时晨空腹取静脉血 4 mL 于真空促凝采血管,3 000 r/min 离心 10 min 后分离血清,−80 ℃ 冰箱保存进行 IL-17、IL-10 批量检测。

1.3.2 外周血 T 细胞亚群检测 分别加入试剂 A(含鼠抗人 CD3-FITC/CD8-PE/CD4-APC/CD45-PerCP) 5 μL 于试管内,再加入 25 μL 全血,震荡混匀,避光温育 10 min;再加入预先 10 倍稀释的溶血素 300 μL,室温避光放置 5 min,待全血溶为红色透明即可上机;上机测试,存盘后用 CELLQuest 软件进行数据分析。

1.3.3 ELISA 检测血清中 IL-17、IL-10 水平 取上述冻存的血清,采用 ELISA 双抗体夹心法检测 IL-17、IL-10,具体操作按照试剂盒说明书进行。用美国 BIORAD680 酶标仪在 450 nm 波长测量每孔的吸光度,所测 OD 值减除空白值,以标准品 OD 值用 curveExpert 1.3 软件绘制出标准曲线,根据待测样品 OD 值分别计算出该患者的 IL-17、IL-10 水平。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对正态分布采用 *t* 检验,非正态分布采用秩和检验。统计结果采用双侧检验,*P* < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 pSS 患者和健康对照组外周血中 T 淋巴细胞亚群表达水平 经统计学处理,与健康对照组比较,pSS 外周血 CD4⁺ 明显下降(*P* < 0.05);CD8⁺ 极明显升高(*P* < 0.05);CD4⁺/CD8⁺ 极明显下降(*P* < 0.05);CD3⁺ 差异无统计学意义(*P* > 0.05);见表 1 及见图 1、2。

2.2 pSS 患者及健康对照组血清 IL-17、IL-10 的表达 经统计学处理,与健康对照组比较,pSS 血清中 IL-17 水平明显升高(*P* < 0.05);而 IL-10 水平极明显降低(*P* < 0.05),见表 2。

表 1 pSS 患者和健康对照组外周血 T 淋巴细胞亚群表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺
pSS 组	89	65.85±6.854	36.90±8.31	28.60±10.66	1.61±0.72
健康对照组	38	67.00±5.311	42.90±3.32	18.40±2.55	2.40±0.42
<i>P</i>		0.368	0.037	0.000	0.003

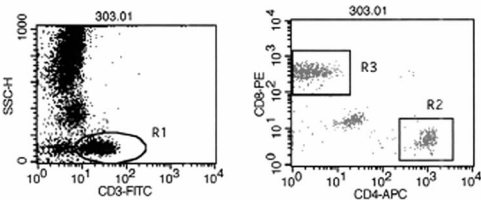


图 1 pSS 外周血 T 淋巴细胞表达分析

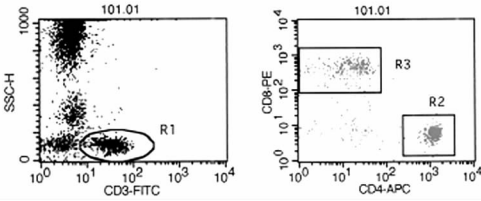


图 2 健康人外周血 T 淋巴细胞表达分析

表 2 pSS 患者和健康对照组血清 IL-17、IL-10 水平($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	<i>n</i>	IL-17	IL-10
pSS 组	89	37.61±14.47	22.24±6.89
对照组	38	10.04±2.71	39.86±10.13
<i>P</i>		0.057	0.000

3 讨 论

pSS 是一种慢性炎性反应疾病。对本病的治疗因暂无有效方法,大多是采用替代治疗及对症治疗,针对因免疫反应导致的组织器官损害,起到控制或延缓的作用。而对 pSS 发病机制的进一步研究将有利于探索本病新的治疗靶点^[4]。

目前对 pSS 的研究中,以免疫学和分子生物学角度研究较多。多数学者认为,T 细胞参与了 pSS 的组织损伤过程。T 细胞作为人体重要的免疫细胞之一,介导细胞免疫,辅助体液免疫。根据细胞表型的不同分为 CD3⁺CD4⁺CD8[−] T 细胞(即 CD4⁺ T 细胞),CD3⁺CD4[−]CD8⁺ 细胞毒性 T 细胞(即 CD8⁺ T 细胞),CD4⁺ T 细胞又可分为炎性细胞(Th1、Th17)、辅助性细胞(Th2)和抑制性细胞(Treg)。而细胞免疫有两种形式:一种是 CD8⁺ CTL 介导的特异性杀伤靶细胞的效应;另一种是 CD4⁺ Th1 细胞介导的以单个核细胞浸润为主的炎性反应。本试验的 pSS 患者外周血 CD3⁺ T 细胞总数与健康对照组相比差异无统计学意义(*P* > 0.05);但 T 细胞亚群中 CD4⁺ T 细胞明显下降,CD8⁺ T 细胞数目明显升高(*P* < 0.05),CD4⁺/CD8⁺ 也明显较健康对照组低(*P* < 0.05),表明 pSS 患者存在 T 细胞免疫功能异常。这与李昕等^[6]、武加标等^[7]的研究结果相一致。

IL-17 是一种主要由 Th17 产生的细胞因子,其促炎作用毋庸置疑,而没有其他冗余功能。它可以清除体内病原体而引发炎性反应,其数量的多少一定程度上可以反映 Th17 细胞的数量或功能。Wong 等^[8]研究显示,与对照组比较,SLE 患者分泌 IL-17A 的 Th17 细胞数量明显增高,患者血浆中 IL-17、IL-23、Th17 水平也明显增高,并且 IL-17 水平与系统性红斑狼疮疾病活动性指数呈正相关。有研究发现,SS 患者唇腺组织中有 IL-17 表达,且在少量淋巴细胞浸润组中表达的比例显著高于多量淋巴细胞浸润组,认为 IL-17 可能在 pSS 疾病发生淋巴细胞浸润的早期起着重要的作用^[9]。孟洁等^[10]研究发现 IL-17 对 B 细胞功能异常可能有协同作用,而导致 pSS 局部炎性反应的损伤过程。作者的研究结果显示,pSS 患者血清 IL-17 较健康对照组显著升高,进一步提示 IL-17 可能参与了 pSS 的发病过程。

IL-10 作为具有抑制炎性反应作用的细胞因子,其抑制作用可解释为它抑制促炎细胞因子的产生,如树突细胞产生的 IL-12、巨噬细胞产生的 TNF,并且下调抗原呈递细胞表面表达主要组织相容性复合体和共刺激分子 CD80 与 CD86,这样抑制了 APC 对 T 细胞的抗原提呈作用,从而导致后续的抑制 T 细胞的活化,进一步影响效应 T 细胞引发炎性反应的能力^[11]。IL-10 不仅被许多适应性免疫系统的细胞表达,包括 T 细胞和 B 细胞,还可由先天免疫细胞,包括树突细胞、巨噬细胞、肥大细胞和自然杀伤细胞分泌。但主要分泌 IL-10 的是一类 CD4⁺ T 细胞亚群——Treg 细胞。研究 IL-10 的数量也可间接反映 Treg 细胞的情况。本试验结果 pSS 患者血清 IL-10 较健康对照组显著下降,显示其对 IL-17 促(下转第 2668 页)

取联合用药手段,以含酶抑制剂复合药物如哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦联合阿米卡星或米诺环素进行干预,有利于 MDR 菌医院感染的控制^[4-5]。

本文资料显示,金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的 MDR 也不容忽视,其检出率分别为 69.44%和 60.58%。在铜绿假单胞菌中,以 CR-PA 为主导,占 73.49%,且主要来源于痰标本。有研究显示,不同标本分离的铜绿假单胞菌对同种抗菌药物的耐药率差异显著,特别是对碳青霉烯类、抗假单胞菌类、β-内酰胺酶复合抑制剂类和Ⅲ代头孢的耐药率,痰分离株远高于创面分泌物^[6]。笔者曾分析报道了痰标本不同耐药机制铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药特征,显示耐亚胺培南铜绿假单胞菌对常用抗菌药物的耐药率显著高于非耐药株^[7]。有文献报道,亚胺培南、美罗培南等碳青霉烯类抗菌药物不仅可以造成铜绿假单胞菌对其本身的耐药,而且还对包括头孢他啶、环丙沙星、哌拉西林在内的多药耐药^[8]。可见,碳青霉烯类抗菌药物不仅可以造成铜绿假单胞菌对其本身的耐药,而且还可使其演变为 MDR 菌。因此,碳青霉烯类抗菌药物在临床的普遍应用,已使铜绿假单胞菌对其耐药性有所升高应引起临床关注^[9]。

从 MRSA 检出情况看,其构成比虽仅占 MDR 菌中的 11.96%,但在金黄色葡萄球菌中的检出率仍达 67.19%。动态分析本院 MRSA 检出趋势,从 2006 年的 93.8%递减到 2010 年的 40.0%,曾呈现过良好的回落势头^[10]。且对常用抗菌药物的耐药谱也发生了显著的改变,尤其对氟喹诺酮类、米诺环素和四环素以及利福平的耐药率亦呈逐年递降趋势。但近年来本院 MRSA 检出情况呈现回升态势,以及对氟喹诺酮类、氨基糖苷类和大环内酯类抗菌药物的耐药率已达“三级”预警界限,要引起临床的关注。

综上所述,本文应用自主研发的《细菌耐药监测预警系统》,分析报告了本院近年来的 MDR 菌监测情况。结果表明,临床检出的 MDR 菌以革兰阴性菌为主,尤以鲍曼不动杆菌的 MDR 最为普遍。在铜绿假单胞菌中以 CR-PA 检出为主,而鲍

曼不动杆菌中则以 PDR-AB 为主。MRSA 构成虽仅 11.96%,但近年呈现的回升态势应引起临床高度关注。

参考文献

[1] 黄学忠,金彬彬,林佩佩,等. 细菌耐药监测预警系统的设计与应用[J]. 东南国防医药,2012,14(4):301-304.

[2] 李春辉,吴安华. 医疗机构药耐 MDR、XDR、PDR 的国际标准化定义专家建议(草案)[J]. 中国感染控制杂志,2011,10(3):238-240.

[3] 李春辉,吴安华. MDR、XDR、PDR 多重耐药菌暂行标准化定义——国际专家建议[J]. 中国感染控制杂志,2014,13(1):62-64.

[4] 徐修礼,陈茂,樊新,等. 联合抗菌药物对多药耐药鲍氏不动杆菌的体外抗菌活性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(9):1122-1124.

[5] 王燕萍,阎琳晶. 多重耐药菌医院内感染的研究现状及预防控制措施[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(2):189-191.

[6] 黄学忠,林佩佩,陈晓飞. 1 385 株临床流行菌株调查及耐药分析[J]. 东南国防医药,2011,13(3):219-222.

[7] 黄学忠,林佩佩,陈晓飞. 痰标本铜绿假单胞菌 224 株 5 年耐药变迁[J]. 检验医学与临床,2013,10(5):560-563.

[8] 周秀珍,孙继梅,刘建华. 连续十年铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药率分析[J]. 中国全科医学,2010,13(13):1467-1469.

[9] 黄学忠,胡招正,林佩佩,等. 烧伤病房五年间细菌分布与耐药性分析[J]. 中华烧伤杂志,2012,28(3):227-229.

[10] 黄学忠,林佩佩,陈晓飞. 某院金黄色葡萄球菌 5 年检出率变化与耐药变迁[J]. 检验医学与临床,2011,8(19):2331-2332.

(收稿日期:2015-04-02 修回日期:2015-04-28)

(上接第 2665 页)

炎因子不能有效地抑制,从而无法对本病的慢性炎性反应起到抑制作用,最终使病情加重。

pSS 是一种复杂的风湿免疫疾病,针对 T 细胞亚群及其细胞因子的研究,有望为患者带来新的治疗方向。

参考文献

[1] Ruddy S, Harris ED Jr, Sledye CB. Kelley's textbook of rheumatology[M]. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company,2001:1028-1035.

[2] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, et al. TGF beta in the context of aninflammatory cytokinemilieu supports de novo differentiation of IL-17 producing T cells[J]. Immunity,2006,24(9):17-18.

[3] 李伟毅,鲍春德. 免疫系统[M]. 上海:上海交通大学出版社,2010:1.

[4] 王琳. 干燥综合征患者外周血 Th17、Treg 及 B 细胞研究[D]. 北京:协和医学院,2009:39.

[5] 中华医学会. 干燥综合征. 临床诊疗指南风湿病分[M]. 2011:40.

[6] 李昕,邱宇杰,韩建平. 原发干燥综合征患者外周血 T 细胞亚群变化的相关研究[J]. 天津医科大学学报,2008,14(1):51-54.

[7] 武加标,任敏,肖菁. 原发性干燥综合征 62 例血清学特点分析[J]. 蚌埠医学院学报,2010,35(11):1093-1095.

[8] Wong CK, Ho CY, Li EK, et al. Elevmion of proinflam-matorycytokine(IL-18, IL-17, IL-2)and the cytokine(IL-4)concentrations inpatients with systemic lupus erythematosis[J]. Lupus,2000,9(8):589-593.

[9] 王喜梅,历小梅,李向培,等. 白细胞介素 17 在原发性干燥综合征患者唇腺组织和外周血的表达[J]. 中华风湿病学杂志,2009,13(5):292-295.

[10] 孟洁,俞大亮,历小梅,等. 干燥综合征中白细胞介素-17 与 B 细胞活化因子对 B 细胞功能异常的协同作用[J]. 中华风湿病学杂志,2013,17(6):369-372.

[11] Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells[J]. J Immunol,1991,146(10):3444-3451.

(收稿日期:2015-04-20 修回日期:2015-05-15)