

强直性脊柱炎患者外周血 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞的表达及意义

徐文莉, 罗 艺, 李 康, 廖长征, 林燕华, 张洪德
(广东省深圳市龙岗中心医院中心实验室 518116)

摘 要:目的 探讨 T 淋巴细胞亚群、自然杀伤性 T 细胞(NKT)在强直性脊柱炎(AS)患者中的临床意义。方法 选取 69 例 AS 患者作为病例组,其中 40 例人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)阳性患者,29 例 HLA-B27 阴性患者,另选取 22 例健康人作为健康对照组。采用流式细胞术测定两组受试者中 T 淋巴细胞亚群、NKT 细胞表达水平。结果 AS 患者外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值与健康对照组比较升高,NKT 细胞百分比下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);ASHLA-B27 阳性患者 CD4⁺/CD8⁺ 比值较 HLA-B27 阴性患者升高,而 NKT 细胞百分比下降,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 AS 患者外周血 CD4⁺/CD8⁺ 比值明显升高、NKT 水平明显下降,可能参与了 AS 的发生。

关键词:强直性脊柱炎; T 淋巴细胞亚群; 自然杀伤性 T 细胞
中图法分类号:R446.1 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2018)02-0192-03

Expression and significance of T lymphocyte subgroup and natural killer T cells
in peripheral blood of ankylosing spondylitis patients

XU Wenli, LUO Yi, LI Kang, LIAO Changzheng, LIN Yanhua, ZHANG Hongde

(Department of Central Laboratory, Longgang Center Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

Abstract: Objective To observe the changes of T cell subsets and natural killer T cells (NKT) in peripheral blood in HLA-B27 positive, negative patients and healthy subjects, and investigate their clinical significance. **Methods** 69 ankylosing spondylitis (AS) patients including 40 HLA-B27 positive cases and 29 HLA-B27 negative cases 22 healthy subjects were enrolled. The levels of T cell subsets and natural killer T cells in peripheral blood were detected by flow cytometry (FCM), and HLA-B27 was detected. **Results** The ratio CD4⁺/CD8⁺ in AS patients was higher than that in healthy subjects ($P<0.05$), the percentage of natural killer T cells was significant lower in AS patients than that in healthy subjects ($P<0.05$). The ratio CD4⁺/CD8⁺ in HLA-B27 positive AS patients was higher than that in HLA-B27 negative AS patients, the percentage of natural killer T cells was low compared with HLA-B27 negative AS patients, but there was not significant ($P>0.05$). **Conclusion** The proportion of CD4⁺/CD8⁺ increased and natural killer T cells decreased might be involved in AS.

Key words: ankylosing spondylitis; T cell subset; natural killer T cell

强直性脊柱炎(AS)是一种主要侵犯中轴关节的全身性、慢性、进行性炎性疾病。以骶髂关节为首发病变部位,病变可累及骶髂关节、脊柱和外周关节,以及眼、心、肺等多器官。起病大多缓慢而隐匿,男性青壮年多见,病情严重可致畸、致残最后导致患者生活不能自理,而且较女性严重。AS 在全球的患病率为 0.1%~1.4%^[1]。AS 的病因和发病机制目前尚未完全阐明^[2],大多认为与遗传、感染、免疫因素等有关^[3-5],但目前淋巴细胞免疫功能异常在 AS 中的研究备受关注^[6-9]。研究发现 T 淋巴细胞亚群在 AS 发病过程起着重要的作用。自然杀伤性 T 细胞(NKT)是一群既有 T 细胞受体又有 NK 细胞受体的淋巴细胞

亚群,以 CD3⁺CD16⁺CD56⁺ 作为 NKT 细胞的表面标志物,其生物学作用主要包括免疫调节和细胞毒作用,被激活后可分泌大量的细胞因子包括 γ -干扰素(γ -IFN)、白细胞介素(IL)-4、IL-10、IL-13 等,发挥免疫调节作用。本研究通过流式细胞术检测 AS 患者以及健康人外周血 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞水平,探讨 T 淋巴细胞亚群及 NKT 与 AS 间的关系,为 AS 的研究提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 7 月至 2016 年 7 月在本院就诊的 AS 患者 69 例作为病例组,其中男 35 例,女 34 例,年龄 19~53 岁。AS 诊断符合 1984 年美国

纽约修订标准^[10]。人类白细胞抗原 B27(HLA-B27) 阳性 40 例,HLA-B27 阴性 29 例。所有患者未接受药物治疗,排除哺乳期、肿瘤病史、近期感染或任何其他慢性炎症疾病患者。另选择同期体检健康者 22 例作为健康对照组,其中男 13 例、女 9 例,年龄 18~51 岁,排除标准同上。两组受试者性别及年龄差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。

1.2 仪器与试剂 仪器: FACSCantoII 流式细胞仪(美国 BD 公司),德国 Eppendorf 5702R 台式离心机, TXYXH-I 旋涡混合器(上海豫明仪器有限公司)。试剂: 硫氨酸荧光素(FITC)-CD3 抗体、藻红蛋白花青苷 7 (PE-Cy7)-CD4 抗体、别藻蓝蛋白花青苷 7 (APC-Cy7)-CD8 抗体、藻红蛋白(PE)-CD16 抗体、藻红蛋白(PE)-56 抗体、HLA-B27 检测试剂盒(HLA-B27Kit)、同型对照抗体 IgG1-FITC、IgG1-PE-Cy7、IgG1-APC-Cy7、IgG-PE、流式细胞仪 7 色校准微球(BD FACS 7-ColorSetup Beads)、红细胞裂解液/溶血素、磷酸盐缓冲液(PBS)均购于美国 BD 公司。

1.3 HLA-B27、淋巴细胞亚群、NKT 细胞检测标本制备 采集受试者空腹静脉血 1 mL,乙二胺四乙酸二钾(EDTA- K_2)抗凝,4 h 内完成流式细胞仪检测。HLA-B27: 采用 BD 公司的 FACSCanto II 流式细胞仪及配套试剂检测 HLA-B27,以试剂设定的 Mark 值为界值,小于 Mark 值为阴性,反之为阳性。淋巴细胞亚群和 NKT 细胞标本制备: 取 50 μ L 的全血与 20 μ L 的抗体混匀,避光 15 min,加 450 μ L 的溶血素混匀,避光 15 min,运行 FACS Diva 软件,将标本置于上样盘中依次收集标本,同时设空白、同型对照,每例收集 2×10^4 个细胞,结果用百分比表示。

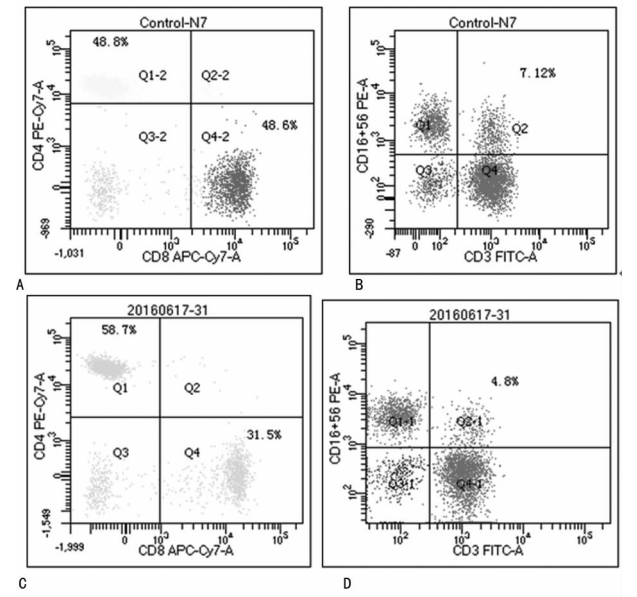
1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析。计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AC 患者与健康对照组 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞检测结果比较 与健康对照组比较,AS 患者 $CD4^+$ T 细胞、 $CD4^+/CD8^+$ 比值明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$); $CD8^+$ T 细胞、NKT 细胞表达水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1 和表 1。

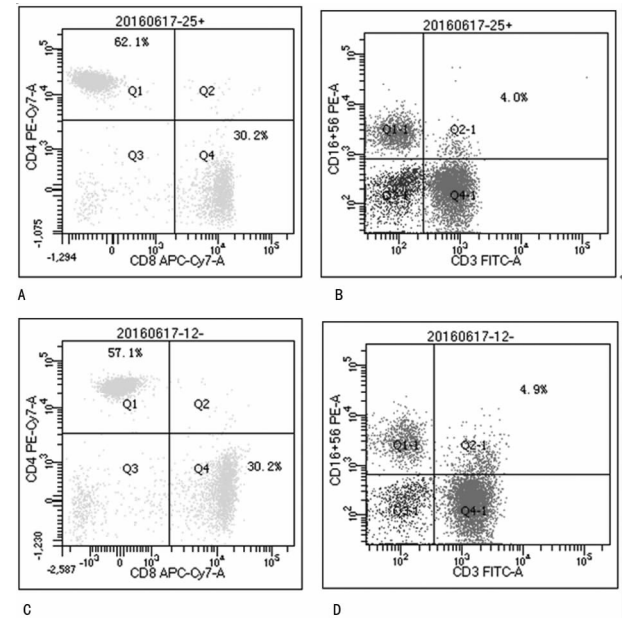
2.2 HLA-27 阳性组与阴性组外周血 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞检测结果比较 与 HLA-27 阴性患者比较,HLA-27 阳性患者 $CD4^+$ T 细胞、 $CD4^+/CD8^+$

比值升高, $CD8^+$ T 细胞、NKT 细胞表达水平降低,但差异均无统计学意义($P>0.05$),见图 2 和表 2。



注:A 为健康对照组 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达;B 为健康对照组 NKT 表达;C 为病例组 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达;D 为病例组 NKT 表达

图 1 流式细胞术检测病例组与健康对照组 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞



注: A 为 HLA-27 阳性组 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达;B 为 HLA-27 阳性组 NKT 表达;C 为 HLA-27 阴性组 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞表达;D 为 HLA-27 阴性组 NKT 表达

图 2 流式细胞术检测 HLA-27 阳性组与阴性组 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞

表 1 病例组及健康对照组 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞检测结果比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T 细胞(%)	CD8 ⁺ T 细胞(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NKT(%)
病例组	69	59.26±1.44*	31.74±0.99*	1.96±0.10*	4.53±0.37*
健康对照组	22	47.88±1.93	39.94±1.72	1.27±0.10	6.96±0.75

注:与健康对照组比较,* $P<0.05$

表 2 HLA-27 阳性组与阴性组 T 淋巴细胞亚群及 NKT 细胞检测结果比较(̄x±s)

组别	n	CD4 ⁺ T 细胞(%)	CD8 ⁺ T 细胞(%)	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	NKT(%)
HLA-27 阳性组	40	61.00±2.29	30.49±1.51	2.10±0.16	4.17±0.49
HLA-27 阴性组	29	57.87±1.81	32.74±1.29	1.85±0.12	4.82±0.53

3 讨 论

AS 的发病与 HLA-B27 分布一致,北方多于南方,多数在青少年晚期和 20 岁以前发病。迄今 AS 的确切发病机制尚未研究透彻,但是随着免疫学动物模型的研究与分子生物学技术的发展,发现免疫紊乱在 AS 发病机制起到重要作用。本研究结果显示,AS 患者外周血中 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达水平及 CD4⁺/CD8⁺ 高于健康对照组;NKT 细胞表达水平低于健康对照组,提示 T 淋巴细胞及 NKT 细胞参与了 AS 疾病的发展。研究表明 Th1/Th2 细胞比例失衡在 AS 发病中具有重要作用^[11-12],NKT 细胞经激活后可分泌大量的细胞因子,参与对机体的免疫调控作用,可同时分泌 Th1/Th2 型细胞因子,其中包括 IL-4 可能影响 Th1/Th2 细胞免疫平衡。已证实 IL-4 是调控 Th2 细胞反应的关键细胞因子,NKT 细胞的一个显著特点是受刺激后能够很快产生大量的 IL-4,而 AS 患者特征是 NKT 细胞数量减少,分泌 IL-4 能力下降,抑制 Th2 细胞的发育,从而导致 Th1 细胞免疫功能增强,引发疾病。此外,NKT 细胞可以有效清除凋亡小体,从而抑制自身反应性 B 细胞的激活,而本研究显示 AS 患者 NKT 细胞数量降低,导致 B 细胞活化,使患者体液免疫反应状态活跃,故引发疾病。

AS 患者 HLA-B27 阴性率小于 10%,发病机制可能与 HLA-B27 阳性不同,其淋巴细胞表达是否存在不同,目前研究较少。本试验从 HLA-B27 阳性、阴性 2 个方面研究,结果显示二者之间 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达水平及 CD4⁺/CD8⁺ 和 NKT 细胞表达水平差异无统计学意义(P>0.05),提示 HLA-B27 抗原存在与否对 CD4⁺、CD8⁺ 细胞及 NKT 细胞水平的影响不大。

综上所述,NKT 细胞表达水平对 AS 发生起着重要作用,进一步研究 NKT 细胞参与 AS 的发生机制,有可能为 AS 的诊断与治疗提供依据,并有望成为临床治疗的靶点以及疗效评价指标。

参考文献

[1] DEAN L E, JONES G T, MACDONALD A G, et al.

Global prevalence of ankylosing spondylitis[J]. Rheumatology, 2014, 53(4): 650-657.

[2] DICARLO E F, KAHN L B. Inflammatory diseases of the bones and joints[J]. Semin Diagn Pathol, 2011, 28(1): 53-64.

[3] BROWN M A, KENNA T, WORDSWORTH B P. Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(2): 81-91.

[4] 曾华, 冯修高, 陈锦华, 等. 强直性脊柱炎的感染因素调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(18): 2780-2781.

[5] NURIEVA R I, PODD A, CHEN Y, et al. STAT5 protein negatively regulates T follicular helper (Tfh) cell Generation and function[J]. J Biol Chem, 2012, 287(14): 11234-11239.

[6] TAYLAN A, SARI I, AKINCI B, et al. Biomarkers and cytokines of bone turnover: extensive evaluation in a cohort of patients with ankylosing spondylitis[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2012, 13: 191-197.

[7] WANG J, ZHAO Q, WANG G, et al. Circulating levels of Th1 and Th2 chemokines in patients with ankylosing spondylitis[J]. Cytokine, 2016, 81: 10-14.

[8] 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.

[9] 蔡春水, 肖平. HLA-B27 阳性强直性脊柱炎患者外周血 Th 与 Tc 细胞亚群分析[J]. 中国热带医学, 2015, 15(11): 1375-1378.

[10] 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.

[11] 徐维家, 李志, 杨婷婷, 等. 系统性红斑狼疮患者 Th17 和 Th1 细胞及其细胞因子水平的变化及临床意义[J]. 检验医学, 2013, 28(5): 396-399.

[12] 钟乃凤, 马莉. 检测不同活动期强直性脊柱炎患者 Th1、Th2、Th17 细胞的临床意义[J]. 检验医学, 2014, 29(5): 477-482.

(收稿日期: 2017-08-19 修回日期: 2017-10-27)