

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.22.005

Th1、Th2、Th17 相关细胞因子与儿童系统性 红斑狼疮疾病活动程度的相关性研究^{*}

王亚辉

盘锦辽油宝石花医院儿科, 辽宁盘锦 124010

摘 要:目的 检测儿童系统性红斑狼疮(cSLE)血液辅助性 T 细胞(Th)亚群 Th1、Th2、Th17 相关细胞因子的表达水平,探讨其与疾病活动程度的相关性,寻找 cSLE 疾病活动期的潜在生物标志物。**方法** 选取该院 cSLE 患儿 47 例作为观察组。依据 SLE 疾病活动度评分(SLEDAI 评分)将观察组分为非活动期组(18 例),活动期组(29 例)。另选取同期该院健康体检儿童 20 例作为对照组。采用流式细胞术检测 3 组研究对象血浆中 Th1 亚群细胞因子白细胞介素(IL)-2、肿瘤坏死因子(TNF)- α 和干扰素(IFN)- γ , Th2 亚群细胞因子 IL-4、IL-6 和 IL-10, Th17 亚群细胞因子 IL-17 表达水平,以及 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞水平。**结果** 非活动期组和活动期组 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 和 IL-17 水平较对照组升高($P<0.05$),活动期组 IL-6、IL-10 和 IL-17 水平高于非活动期组($P<0.05$)。活动期组 CD4⁺/CD8⁺ 低于对照组($P<0.05$)。血清 IL-6 水平与 IL-10、IL-17 呈正相关($r=0.415, 0.497, P<0.05$), IL-10 水平与 IL-17 呈正相关($r=0.402, P<0.05$)。血清 IL-6、IL-10、IL-17 水平与 SLEDAI 评分呈正相关($r=0.373, 0.440, 0.412, P<0.05$)。IL-6 预测 cSLE 活动程度的最佳临界值为 23.25 pg/mL,曲线下面积(AUC)为 0.907($P<0.05$);IL-10 预测 cSLE 活动程度的最佳临界值为 32.50 pg/mL, AUC 为 0.853($P<0.05$);IL-17 预测 cSLE 活动程度的最佳临界值为 33.00 pg/mL, AUC 为 0.767 ($P<0.05$)。**结论** 血清 IL-6、IL-10 和 IL-17 与 cSLE 疾病活动程度具有相关性,IL-6 和 IL-10 的预测效能高于 IL-17,可作为预测疾病活动程度的生物标志物。

关键词:儿童系统性红斑狼疮; 白细胞介素-6; 白细胞介素-10; 白细胞介素-17

中图法分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)22-3233-04

Correlation between Th1, Th2 and Th17 related cytokines with disease activity degree of child systemic lupus erythematosus^{*}

WANG Yahui

Department of Pediatrics, Panjin Liaoyou Baoshihua Hospital, Panjin, Liaoning 124010, China

Abstract: Objective To detect the expression levels of Th1, Th2, and Th17 related cytokines in child systemic lupus erythematosus (cSLE), and to investigate their correlation with the degree of disease activity, and look for the potential biomarkers of the active stage in cSLE. **Methods** Forty-seven children patients with cSLE in this hospital were selected as the observation group and divided into the non-active stage group (18 cases) and active stage group (29 cases) according to the SLEDAI score. Contemporaneous 20 children undergoing the healthy physical examination were selected as the control group. The flow cytometry was used to detect the levels of interleukin (IL)-2, TNF- α and IFN- γ in Th1 subset cytokines IL-4, IL-6 and IL-10 in Th2 subset cytokines, IL-17 in Th17 subset cytokines, and CD4⁺T and CD8⁺T cells. **Results** The levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 and IL-17 in the non-active stage group and active stage group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), and the levels of IL-6, IL-10 and IL-17 in the active stage group were higher than those in the non-active stage group ($P<0.05$). The ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the active stage group was lower than that of the control group ($P<0.05$). The serum IL-6 level was positively correlated with IL-10 and IL-17 ($r=0.415, 0.497, P<0.05$), and the IL-10 level was positively correlated with IL-17 ($r=0.402, P<0.05$). The levels of IL-6, IL-10 and IL-17 were positively correlated with the SLEDAI score ($r=0.373, 0.440, 0.412, P<0.05$). The optimal cut-off value of IL-6 for predicting cSLE activity was 23.25 pg/mL, the area under the curve (AUC) was 0.907 ($P<0.05$), the optimal cut-off value of IL-10 for predic-

^{*} 基金项目:辽宁省博士科研启动基金项目(2020-BS-246)。

作者简介:王亚辉,女,主治医师,主要从事小儿内科疾病致病机制的相关研究。

本文引用格式:王亚辉. Th1、Th2、Th17 相关细胞因子与儿童系统性红斑狼疮疾病活动程度的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18

ting cSLE activity was 32.50 pg/mL, AUC was 0.853 ($P<0.05$), which of IL-17 was 33.00 pg/mL, AUC was 0.767 ($P<0.05$). **Conclusion** The serum IL-6, IL-10 and IL-17 levels show the correlation with the disease activity degree of cSLE, the predictive efficiency of IL-6 and IL-10 are higher than that of IL-17, and can be used as the biomarkers for predicting the disease activity,

Key words: child systemic lupus erythematosus; interleukin-6; interleukin-10; interleukin-17

系统性红斑狼疮(SLE)是一种自身免疫性和多系统慢性炎症性疾病,累及皮肤、关节、肾脏、肺和脑等^[1]。SLE的发病机制尚未完全明确,主要涉及T细胞和B细胞的过度活跃、多克隆B细胞活化产生致病性自身抗体、自身抗原清除不良、免疫复合物沉积,以及血浆细胞因子异常等^[2]。10%~20%的儿童系统性红斑狼疮(cSLE)起病于儿童期和青春期,发病率约为0.5/10万,在免疫学和临床表现等方面较成人SLE有许多不同之处^[3]。且儿童发病隐匿,就诊原因复杂、临床表现多样化,尤其是不典型、轻症或处于疾病早期的cSLE患儿容易被误诊或漏诊,因此寻找cSLE特异性免疫检测指标和临床指标对疾病的诊断十分重要。

细胞因子在调节免疫应答中起关键作用,其通常由T细胞、B细胞、自然杀伤细胞等免疫细胞合成,在固有免疫和适应性免疫中诱导局部炎症和全身急性期保护反应。研究表明,细胞因子信号转导受损可导致自身免疫功能异常,并且能加剧疾病的严重程度^[4]。辅助性T细胞(Th)亚群Th1、Th2和Th17产生的肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6和IL-17等细胞因子在SLE的发病机制中发挥关键作

用^[5]。本研究通过分析Th亚群相关细胞因子的表达及其与疾病活动程度的相关性,探讨cSLE疾病活动期的潜在生物标志物。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2017年1月至2020年12月于本院儿科就诊的cSLE患儿47例作为观察组。所有cSLE患儿均符合美国风湿病学会(ACR)1997年修订的诊断标准。依据SLE疾病活动度评分(SLEDAI评分)将观察组分为非活动期组(≤ 6 分,18例),活动期组(>6 分,29例)。另选取同期来本院体检的健康体检儿童20例作为对照组。本研究经医院伦理委员会批准,所有研究对象家属均签署知情同意书。与对照组比较,非活动期组和活动期组cSLE患儿红细胞沉降率(ESR)、C反应蛋白(CRP)、尿蛋白、抗双链DNA抗体(anti-dsDNA)水平和SLEDAI评分升高($P<0.05$),补体C3和C4水平有小幅降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与非活动期组比较,活动期组ESR、CRP、尿蛋白、anti-dsDNA水平和SLEDAI评分有不同程度上升($P<0.05$)。3组年龄、性别构成比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 各组研究对象一般资料比较

项目	对照组($n=20$)	非活动期组($n=18$)	活动期组($n=29$)
男/女(n/n)	3/17	3/15	4/25
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	13.68 $\pm$ 4.09	13.17 $\pm$ 3.70	14.62 $\pm$ 3.45
C3($\bar{x}\pm s$,g/L)	0.97 $\pm$ 0.24	0.63 $\pm$ 0.35	0.59 $\pm$ 0.21
C4($\bar{x}\pm s$,g/L)	0.30 $\pm$ 0.07	0.22 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.07
ESR($\bar{x}\pm s$,mm/h)	9.29 $\pm$ 3.64	19.86 $\pm$ 7.43 ^a	31.03 $\pm$ 9.20 ^{ab}
CRP($\bar{x}\pm s$,mg/L)	1.02 $\pm$ 0.45	10.71 $\pm$ 5.79 ^a	22.58 $\pm$ 8.62 ^{ab}
尿蛋白($\bar{x}\pm s$,mg/24 h)	0.00 $\pm$ 0.00	20.98 $\pm$ 11.52 ^a	80.12 $\pm$ 22.30 ^{ab}
anti-dsDNA($\bar{x}\pm s$,IU/mL)	0.00 $\pm$ 0.00	73.36 $\pm$ 30.01 ^a	196.70 $\pm$ 43.56 ^{ab}
SLEDAI评分($\bar{x}\pm s$,分)	0.00 $\pm$ 0.00	2.95 $\pm$ 1.36 ^a	8.28 $\pm$ 3.99 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与非活动期组比较,^b $P<0.05$ 。

1.2 仪器与试剂 全自动血细胞分析仪和离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司,流式细胞仪FACS Canto购自美国BD公司。CD4⁺、CD8⁺T细胞亚群检测试剂盒(流式细胞仪法-6色)购自碧迪医疗器械上海有限公司,人Th1/Th2/Th17亚群检测试剂盒(流式荧光法)购自江西赛基生物有限公司,BD VacutainerTM血样采集管和TrucountTM绝对计数管购自

美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 Th1、Th2和Th17亚群相关细胞因子检测 使用BD VacutainerTM采血管无菌采集静脉血5 mL,2 000 r/min离心5 min,准备血浆标本0.5 mL。配置标准品:取300 μ L标准品原液至300 μ L样品稀释液中混匀,标记为管1,再从管1中取300 μ L加至

300 μL 样品稀释液中混匀,标记为管 2,如此倍比稀释至稀释度为 1 : 512。标本染色:捕获微球混合液(A)1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入与上清液等体积的微球缓冲液(H),混匀,避光 30 min;混匀,每管加 25 μL 捕获微球混合液;样品管每管加 25 μL 待测血浆标本;标准品管每管加 25 μL 稀释标准品;将荧光检测试剂(C)按 25 微升/管加至所有管中,混匀,避光 2.5 h,每管加 1 mL 磷酸盐缓冲液(PBS),1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;每管加 100 μL PBS,于流式细胞仪 FACS Canto 上机检测。

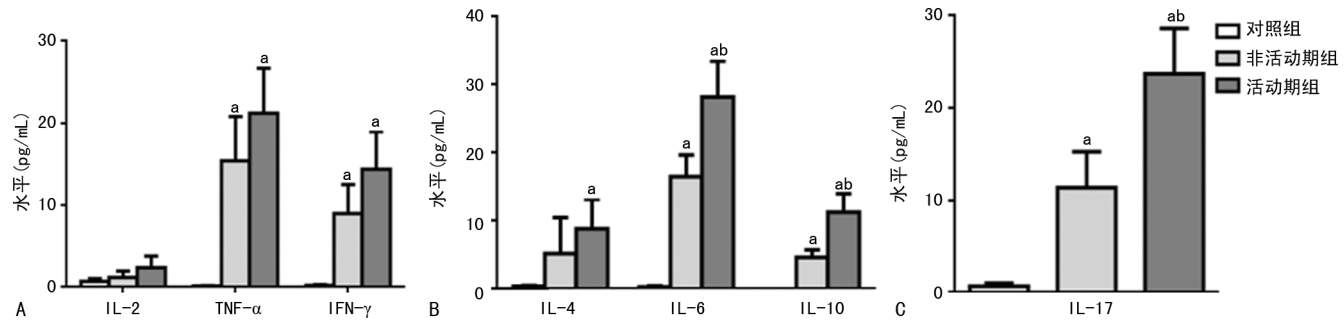
1.3.2 CD4^+ T 和 CD8^+ T 细胞亚群检测 取 CD4^+ 、 CD8^+ T 细胞亚群检测试剂 20 μL 至 BD Trucount™ 绝对计数管内,用反向移液技术吸取抗凝全血 50 μL ,加入至 BD Trucount™ 绝对计数管,混匀,室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)避光孵育 15 min,取 450 μL BD 流式细胞术(FACS)(1 $\times$)溶血素加入管中,混匀,室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)避光孵育 15 min,流式细胞仪 FACS Canto 上机检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 和 GraphPad

Prism 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK- q 检验;计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;采用 Pearson 相关分析指标间的相关性;采用受试者工作特征(ROC)曲线评价细胞因子对 cSLE 活动程度的预测价值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

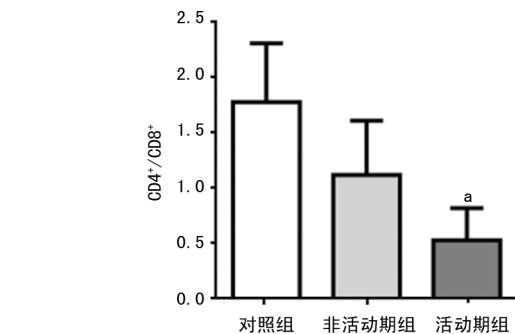
2.1 cSLE 患儿 Th1、Th2 和 Th17 亚群相关细胞因子水平 与对照组相比,非活动期组和活动期组 cSLE 患儿 Th1 亚群细胞因子 TNF- α 和干扰素(IFN)- γ ,Th2 亚群细胞因子 IL-6 和 IL-10,Th17 亚群细胞因子 IL-17 水平增加($P < 0.05$)。与对照组比较,活动期组 Th2 亚群细胞因子 IL-4 水平呈升高趋势($P < 0.05$)。与非活动期组比较,活动期组 IL-6、IL-10 和 IL-17 水平升高($P < 0.05$),IL-4、TNF- α 和 IFN- γ 水平呈上升趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。



注:A 为 Th1 亚群;B 为 Th2 亚群;C 为 Th17 亚群;与对照组比较,^a $P < 0.05$;与非活动期组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 1 Th1、Th2 和 Th17 亚群细胞因子水平比较

2.2 各组 CD4^+ / CD8^+ 比较 与对照组比较,活动期组 cSLE 患儿 CD4^+ / CD8^+ 降低($P < 0.05$),非活动期组 CD4^+ / CD8^+ 仅小幅下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。非活动期组和活动期组 CD4^+ / CD8^+ 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2。



注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

图 2 各组 $\text{CD4}^+/\text{CD8}^+$ 变化情况

2.3 cSLE 患儿血清 IL-6、IL-10 水平与 IL-17 的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,cSLE 患儿血

清 IL-6 水平与 IL-10、IL-17 均呈正相关($r = 0.415$ 、 0.497 , $P < 0.05$)。血清 IL-10 水平与 IL-17 水平呈正相关($r = 0.402$, $P < 0.05$)。

2.4 cSLE 患儿血清 IL-6、IL-10、IL-17 水平与 SLE-DAI 评分的相关性分析 Pearson 相关分析结果显示,cSLE 患儿血清 IL-6、IL-10、IL-17 水平与 SLE-DAI 评分均呈正相关($r = 0.373$ 、 0.440 、 0.412 , $P < 0.05$)。

2.5 ROC 曲线分析 ROC 曲线分析显示:IL-6 最佳临界值为 23.25 pg/mL,灵敏度为 82.1%,特异度为 84.2%,曲线下面积(AUC)为 0.907($P < 0.05$);IL-10 最佳临界值为 32.50 pg/mL,灵敏度为 78.6%,特异度为 84.3%,AUC 为 0.853($P < 0.05$);IL-17 最佳临界值为 33.00 pg/mL,灵敏度为 75.0%,特异度为 63.2%,AUC 为 0.767($P < 0.05$)。

3 讨论

SLE 是一种慢性自身免疫性疾病,其典型病理生理学机制涉及抗核抗体的产生,免疫复合物在全身基

底膜中的沉积以及其引起的炎症反应^[6]。cSLE 呈现出的临床表现和严重的并发症,可能是由于促炎性细胞因子所致。持续且过量的细胞因子产生是自身免疫性疾病的标志,并且在疾病的发病机制中发挥重要作用^[7]。研究发现,Th1 通过产生 IFN- γ 介导针对细菌和病毒等微生物感染的免疫应答,但不受控制的 Th1 会导致多种自身免疫性疾病^[8]。LI 等^[9]报道 SLE 和类风湿性关节炎(RA)等自身免疫性疾病患者血液中 Th1 亚群细胞因子 IL-1 β 和 IFN- γ 、Th2 亚群细胞因子 IL-6、Th17 亚群细胞因子 IL-17A 和 IL-23 水平均明显升高,并提出细胞因子可能是监测和预测 SLE 严重程度的重要指标。本研究通过检测 cSLE 患儿 Th1、Th2 和 Th17 亚群细胞因子的水平,分析高表达的细胞因子与疾病活动程度的相关性,探讨预测 cSLE 疾病活动期的潜在生物标志物。

本研究结果显示,cSLE 患儿活动期组 ESR、CRP、尿蛋白、anti-dsDNA 水平相比对照组和非活动期组均有不同程度升高($P < 0.05$)。活动期 CRP 和 ESR 的升高提示疾病可能伴发感染或组织损伤;血清 anti-dsDNA 多属 IgG 型抗体,其水平升高提示 B 细胞过度活化产生高滴度抗自身 DNA 和细胞核组分的抗体,可针对性攻击自身组织,造成组织和器官的损伤;尿蛋白的检出提示患儿出现肾脏损伤或肾功能减退,可能合并感染等并发症。与对照组比较,活动期组 cSLE 患儿 CD4⁺/CD8⁺ 降低($P < 0.05$)。cSLE 患儿体内免疫复合物在脏器沉积,使驻留的免疫细胞数量增加,CD4⁺ T 细胞的 Th1、Th2、Th17 和调节性 T 细胞(Treg)等多个淋巴细胞亚群失衡。CD4⁺ 是直接反映机体免疫力的重要指标,CD4⁺/CD8⁺ 降低提示机体处于免疫失衡状态,CD4⁺、CD8⁺ 的变化及 CD4⁺/CD8⁺ 失衡在 SLE 的发病中起重要作用。细胞因子检测结果显示,与健康儿童相比,cSLE 患儿 Th1 亚群 TNF- α 和 IFN- γ 、Th2 亚群 IL-6 和 IL-10、Th17 亚群 IL-17 水平均有不同程度的增加($P < 0.05$);疾病活动期 IL-6、IL-10 和 IL-17 水平较非活动期升高($P < 0.05$)。对本研究高度差异性表达的细胞因子 IL-6、IL-10 和 IL-17 的相关性分析发现,IL-6 水平与 IL-10、IL-17 均呈正相关($r = 0.415, 0.497, P < 0.05$),IL-10 水平与 IL-17 呈正相关($r = 0.402, P < 0.05$)。IL-6 促进 Th17 分化并分泌 IL-17,同时 IL-17 会促进 IL-6 的产生,Th17 细胞途径与 IL-6 之间存在正反馈回路。细胞因子 IL-10 在 SLE 中的致病机制存在争议,通常认为 IL-10 促进了自身反应性 B 细胞的生长和分化^[10]。IL-10 水平与 IL-6、IL-17 呈正相关,提示三者可协同促进 T 和 B 细胞的自身免疫应答反应。血清 IL-6、IL-10、IL-17 与 SLEDAI 评分均呈正相关($r = 0.373, 0.440, 0.412, P < 0.05$),表明 IL-6、IL-10、IL-17 水平越高,SLE 疾病活跃程度越高,病情越

严重。ROC 曲线显示,3 个细胞因子的早期检测和定量分析有助于预测 cSLE 疾病活动度,可用于评估疾病的活跃度和恶性程度,且 IL-6 水平的预测效能高于 IL-10 和 IL-17。

综上所述,Th 亚群细胞因子 IL-6、IL-10 和 IL-17 在 cSLE 的发病机制及疾病的发展中发挥重要作用。血清 IL-6、IL-10 和 IL-17 水平可作为 cSLE 患者疾病活动程度判断的备选生物标志物。

参考文献

- [1] GRACIA-RAMOS A E, SAAVEDRA-SALINAS M Á. Can the SARS-CoV-2 infection trigger systemic lupus erythematosus? a case-based review[J]. *Rheumatol Int*, 2021, 41(4): 799-809.
- [2] VAN DAM L S, OSMANI Z, KAMERLING S W A, et al. A reverse translational study on the effect of rituximab, rituximab plus belimumab, or bortezomib on the humoral autoimmune response in SLE[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2020, 59(10): 2734-2745.
- [3] 崔艳萍, 李乐鹏, 刘升云. 儿童首发系统性红斑狼疮与自身免疫性溶血性贫血的临床研究[J]. *中国实用医刊*, 2017, 44(14): 77-81.
- [4] CASTEJON M L, SÁNCHEZ-HIDALGO M, APARICIO-SOTO M, et al. Dietary oleuropein and its new acyl-derivate attenuate murine lupus nephritis through HO-1/Nrf2 activation and suppressing JAK/STAT, NF- κ B, MAPK and NLRP3 inflammasome signaling pathways[J]. *J Nutr Biochem*, 2019, 74: 108229.
- [5] SELVARAJA M, ABDULLAH M, ARIP M, et al. Elevated interleukin-25 and its association to Th2 cytokines in systemic lupus erythematosus with lupus nephritis[J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0224707.
- [6] DARMAWAN G, HAMJOYO L, OEHADIAN A, et al. Cerebral venous sinus thrombosis in systemic lupus erythematosus[J]. *Acta Med Indones*, 2018, 50(4): 343-345.
- [7] SALVI V, GIANELLO V, TIBERIO L, et al. Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases[J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 15.
- [8] PANG J, DING J, ZHANG L, et al. Effect of recombinant serine protease from adult stage of *Trichinella spiralis* on TNBS-induced experimental colitis in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 86: 106699.
- [9] LI M, YANG C, WANG Y, et al. the expression of P2X7 receptor on Th1, Th17, and regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis and its correlations with active disease[J]. *J Immunol*, 2020, 205(7): 1752-1762.
- [10] GEGINAT J, VASCO M, GEROSA M, et al. IL-10 producing regulatory and helper T-cells in systemic lupus erythematosus[J]. *Semin Immunol*, 2019, 44: 101330.