

分泌减少时会减弱对蓝斑的抑制作用,导致蓝斑的激活引起颅内血管收缩,随刺激加大颅内外血管均扩张,同时造成去甲肾上腺素能活性增强,儿茶酚胺大量释放激活血小板释放 5-羟色胺(5-HT),引起一系列级联反应^[9]。CGRP 是迄今为止发现的外周和中枢扩张最强的神经肽,是导致神经血管扩张的主要因素之一。但本实验提示模型组 CGRP 含量较溶媒组有升高的趋势,但差异没有统计学意义。CGRP 由三叉神经血管末梢释放,主要通过扩张大脑和硬脑膜血管、释放肥大细胞炎症介质、传递颅内血管伤害性信息至中枢等方式在偏头痛发病中发挥着关键作用^[10]。CGRP 表达部位多在硬膜等大脑疼痛组织处。本实验检测的是腹主动脉血 CGRP,故含量增高不显著。

c-fos 基因是研究较为深入的即刻早期基因之一,其激活和表达可作为神经活动和基因活动的功能标志,是脑功能定位研究的标记之一。fos 的免疫反应性为神经元亚群受到伤害性刺激和相关伤害路径判定提供了一个很好的鉴别方法。在偏头痛的疼痛路径中(导水管周围灰质、下丘脑)应用甚广。本研究发现中脑导水管附近模型组 c-fos 阳性细胞表达增多,提示 DA、GTN 诱导的血管舒缩在此有中枢伤害。刘若卓等^[11]采用电刺激大鼠上矢状窦硬脑膜发现 Fos 免疫反应阳性神经元主要位于中脑 PAG 的腹外侧区,提示该区神经元激活参与了头痛的痛觉传导通路。尽管本实验采用动物模型与此不同,但是 c-fos 表达部位却类似。

偏头痛是中枢神经系统(CNS)对多种刺激的一种特殊应答反应,皮下注射 DA、GTN 后观察到 ET、SP 含量增多,ET、SP 诱导的血管舒缩及其中枢应答、低 β -EP 的痛觉增敏和 PAG 可能参与偏头痛的调控。刺激、c-fos 基因表达、血管活性物质(ET、SP 及

β -EP 等)之间的相关性目前仍未知晓,可作为以后研究的重点,用来进一步阐明偏头痛的发病机制。

参考文献

- 1 章正祥,曹克刚,高永红,等.多巴胺、硝酸甘油诱导血管舒缩异常 SD 大鼠模型的建立[J].中国实验方剂学杂志,2009,15(7):65-68,71
- 2 李凡,舒斯云,包新民.多巴胺受体的结构和功能[J].中国神经科学杂志,2003,19(6):405-410
- 3 Charbit AR, Akerman S, Goadsby PJ. Trigemino-cervical complex responses after lesioning dopaminergic A11 nucleus are modified by dopamine and serotonin mechanisms[J]. Pain, 2011, 152(10): 2365-2376
- 4 Olesen J. The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache[J]. Pharmacol Ther, 2008, 120(2): 157-171
- 5 George Paxinos, Charles Watson. 大鼠脑立体定位图谱[M].3版.北京:人民卫生出版社,2005
- 6 Joshi G, Pradhan S, Mittal B. Vascular gene polymorphisms (EDNRA -231 G>A and APOE HhaI) and risk for migraine[J]. DNA Cell Biol, 2011, 30(8): 577-584
- 7 Mosnaim AD, Diamond S, Wolf ME, et al. Endogenous opioid-like peptides in headache. An overview[J]. Headache, 1989, 29(6): 368-372
- 8 Nappi G, Facchinetti F, Martignoni E, et al. Plasma and CSF endorphin levels in primary and symptomatic headaches[J]. Headache, 1985, 25(3): 141-144
- 9 Lance JW, Lambert GA, Goadsby PJ, et al. Brainstem influences on the cephalic circulation: experimental data from cat and monkey of relevance to the mechanism of migraine[J]. Headache, 1983, 23(6): 258-265
- 10 Durham PL. CGRP-receptor antagonists - a fresh approach to migraine therapy? [J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1073-1075
- 11 刘若卓,于生元,王贺波,等.刺激大鼠上矢状窦区硬脑膜对中脑导水管周围灰质 c-fos 蛋白表达的影响[J].中国康复医学杂志,2003,18(1): 10-13 (收稿日期:2012-08-28)
(修回日期:2012-09-26)

系统性红斑狼疮患者外周血调节性 T 细胞与 Th17 细胞失衡的研究

马纪林 蔡 龙 施华萍 周红娟 刘小贤 汪 卫 郑红霞 于健宁

摘 要 目的 通过检测系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)患者外周血 CD4⁺CD25^{high}调节性 T 细胞(regu-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81274161,81001307);浙江省自然科学基金资助项目(Y2090918);浙江省医药卫生科学研究基金计划项目(2012RCA046,2011KYA137,2007A162);杭州市科技发展计划项目(20080333Q28,20110733Q15,20110833B26)

作者单位:310003 杭州,浙江省中西医结合医院风湿免疫肾脏科

laory T cells, Treg)与 Th17 细胞的比例,来探讨 Treg/Th17 细胞的失衡在 SLE 发病中的作用。方法 采用流式细胞仪检测 52 例 SLE 患者(其中活动组 38 例)及 22 名健康对照者的外周血 CD4⁺CD25^{high}T 细胞、Th17 细胞的比例,并分析与疾病活动指数(systemic lupus erythematosus activity index, SLEDAI)的相关性。结果 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25^{high}T 细胞和 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的比例与对照者相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),且与 SLEDAI 无相关性。CD4⁺CD25^{high}T 细胞与 Th17 细胞的比率在活动组 SLE 中下降尤为明显($P < 0.05$),且与 SLEDAI 呈明显的负相关($P < 0.05$)。结论 活动性 SLE 患者外周血 Treg 与 Th17 细胞的比率明显下降,并与疾病活动密切相关,说明两群细胞的失衡可能在 SLE 的发生和发展中起重要作用。

关键词 系统性红斑狼疮 调节性 T 细胞 Th17 细胞

Study on the Imbalance of CD4⁺CD25^{high} Regulatory T Cells/Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Ma Jilin, Cai Long, Shi Huaping, Zhou Hongjuan, Liu Xiaoxian, Wang Wei, Zheng Hongxia, Yu Jianning. Department of Rheumatology, Immunology and Nephrology, Zhejiang Traditional Chinese Medicine and Western Medicine Hospital, Zhejiang 310003, China

Abstract Objective To investigate the frequency of CD4⁺CD25^{high} T cells and Th17 cells in the peripheral blood of systemic lupus erythematosus (SLE) patients, and to explore the role of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells/Th17 cells imbalance in the pathogenesis of SLE. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 52 patients including 38 active SLE and 22 healthy controls were stained for CD4, CD25 and intracellular IL-17. Cells were examined for 3-color staining on the Epics XL-MC and data were analyzed using EXPO32 software. Disease activity was assessed by systemic lupus erythematosus activity index (SLEDAI). **Results** The frequency of CD4⁺CD25^{high}T cells and Th17 cells was not correlated to SLE development and the disease activity ($P > 0.05$), but the ratio of CD4⁺CD25^{high}T cells and Th17 cells in active SLE patients was significantly lower than that in inactive SLE patients and healthy controls ($P < 0.05$). Moreover, this ratio was inversely correlated with the SLEDAI scores ($P < 0.05$). **Conclusion** This study demonstrates that the ratio of CD4⁺CD25^{high} Treg cells to Th17 cells is decreased in the peripheral blood of active SLE patients. The imbalance between Treg cells and Th17 cells may play an important role in the pathogenesis of SLE.

Key words Lupus erythematosus systemic; Regulatory T cells; Th17 cells

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是一种病因尚未完全明确的累及多个器官的自身免疫性疾病,目前认为免疫失衡在其发病中起到重要作用。调节性 T 细胞和 Th17 细胞是新近发现的两群 CD4⁺T 细胞亚群,在自身免疫性疾病中的作用越来越受到重视,调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)是一群能“主动”地抑制免疫反应的细胞,而 Th17 细胞是促炎症细胞,能分泌 IL-17A 和 IL-17F,引起组织的免疫炎症^[1,2]。两群细胞的分化和功能存在相互抑制,在正常状态下能保持平衡,以维持机体的免疫稳定,然而一旦失衡则导致自身免疫病的发生^[3]。本研究通过检测 SLE 患者外周血 CD4⁺CD25^{high}调节性 T 细胞和 Th17 细胞的比例及两者的比例,来探讨 Treg 与 Th17 细胞的免疫失衡在 SLE 发病中的作用。

对象与方法

1. 研究对象:本研究遵循伦理学标准,并得到本单位伦理委员会批准,所有受试者均签署知情同意书。52 例患者来自笔者医院风湿免疫肾脏科 2008 年 9 月~2011 年 12 月期间的住院或门诊患者,诊断均符合 1997 年美国风湿病学会制定的 SLE 诊断标准,采用 SLE 疾病活动指数(SLEDAI)判断疾病活动程度并分组。同时选择 22 名体检的健康人群为对照组。

2. 实验方法:(1)主要试剂:藻红素(PE)标记的鼠抗人

CD4,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的鼠抗人 CD25 及同型对照均购自美国 BD 公司,FITC 标记的鼠抗人的 IL-17A 及同型对照购自 eBioscience 公司。佛波酯、离子霉素和莫能霉素均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,RPMI 1640 购自美国 Gibco 公司。(2)Th17 细胞的检测:空腹抽取 SLE 患者和健康对照组静脉血,肝素抗凝,接种至 24 孔培养板,每孔加入 50ng/ml 佛波酯和 750ng/ml 离子霉素,孵育 1h 后加入 10μg/ml 莫能霉素,在 37℃,5% CO₂ 细胞培养箱孵育 4h 后收集细胞,取 500μl 细胞于流式专用试管中,分为测定管和同型对照管,加入 20μl 的 PE 标记的鼠抗人 CD4 单抗,4℃ 避光孵育 30min, PBS 洗涤 2 次,固定液室温避光固定反应 20min 后离心弃去上清,PBS 洗涤 2 次。加入破膜剂进行细胞打孔,离心弃去上清后进行细胞因子染色。测定管加入 0.5μl FITC 标记的 IL-17A,对照管加入同型对照,4℃ 避光孵育 30min。(3)CD4⁺CD25^{high}T 细胞检测:取肝素抗凝全血 3ml,分别加入 20μl 的 PE 标记的鼠抗人 CD4 单抗和 FITC 标记的鼠抗人 CD25 单抗,并设立同型对照管。混匀后避光 15min,再加入 1ml 红细胞裂解液,37℃ 孵育 10min,离心弃去上清,PBS 洗涤 3 次。(4)流式细胞仪检测:Epics XL-MCL 型流式细胞分析仪(Beckman-Coulter 公司),按常规操作进行,EXPO32 软件分析结果,根据向散射光和侧向散射光以淋巴细胞群设门,分别测定 SLE 患者和健康对照组 CD4⁺CD25^{high}T 细胞和 Th17 细胞占 CD4⁺T 细胞的百分率,其中 CD4⁺CD25^{high}T 细胞定义为 2 倍于 CD25 的荧光表达强度的 CD4⁺T 细胞。

3. 统计学方法:采用 SigmaStat3.5 统计软件进行分析处

理。计量数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析(AVONA),两组间比较采 t 检验或 *Mann - Whitney U* 检验。计数资料的比较采用 χ^2 检验。变量间的相互关系用 *Pearson* 相关分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 一般资料:两组患者的资料见表 1,SLE 组患者 52 例,其中女性 46 例,男性 6 例,患者年龄 19 ~ 48 岁,按 SLEDAI ≥ 6 分为界限分为活动组和非活动组,活动组 38 例,其中初发患者 15 例,单用泼尼松 14 例,泼尼松联合环磷酰胺 5 例,泼尼松联合雷公藤多甙 4 例;非活动组 14 例,其中单用泼尼松 7 例,泼尼松联合环磷酰胺 6 例,泼尼松联合霉酚酸酯 1 例;活动组和非活动组 SLE 在 SLEDAI 的差异有统计学意义($P < 0.001$)。健康对照组 22 名,其中女性 19 名,男性 3 名,年龄 20 ~ 47 岁,平均年龄 34 岁,3 组在年龄和性别上均可匹配($P > 0.05$)。

表 1 3 组间一般临床资料比较

组别	<i>n</i>	性别 (男性/女性)	年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	SLEDAI (分, $\bar{x} \pm s$)
SLE 组	52	6/46		
活动组	38	4/34	37.7 $\pm$ 5.2	13.24 $\pm$ 4.28
非活动组	14	2/12	37.5 $\pm$ 5.0	3.21 $\pm$ 1.19
健康对照组	22	3/19	38.2 $\pm$ 5.9	-
$\chi^2(F, t)$	6.00	0.089	105.00	
<i>P</i>	0.199	0.915	<0.001	

2. SLE 患者外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的比例及与疾病的相关性:SLE 组和对照组外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的比例分别为 1.29% $\pm$ 0.21%、1.40% $\pm$ 0.29%,两组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中在 SLE 患者中,活动组和非活动组外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞的比例分别为 1.26% $\pm$ 0.18%、1.38% $\pm$ 0.27%,两组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。活动组和非活动组 SLE 患者与对照组相比,差异也无统计学意义($P > 0.05$) (表 2)。SLE 患者外周血 CD4⁺CD25^{high}T 细胞的比例与 SLEDAI 无相关性 (*Pearson* 相关系数 r 为 -0.268, $P > 0.05$)。

3. SLE 患者外周血 Th17 细胞的比例及与疾病的相关性:如表 2 所示,SLE 组和对照组外周血 Th17 细胞的比例分别为 2.45% $\pm$ 0.43%、2.28% $\pm$ 0.35%,两组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中在 SLE 患者中,活动组、非活动组外周血 Th17 细胞的比

例分别为 2.53% $\pm$ 0.43%、2.25% $\pm$ 0.41%,两组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。活动组和非活动组 SLE 患者与对照组相比,差异也无统计学意义($P > 0.05$)。SLE 患者外周血 Th17 细胞的比例与 SLEDAI 无相关性 (*Pearson* 相关系数 r 为 0.193, $P > 0.05$)。

表 2 SLE 患者与健康对照者外周血 Treg 和 Th17 细胞的比例及两者的比率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ CD25 ^{high} (%)	Th17 (%)	Treg/Th17
SLE 组	52	1.29 $\pm$ 0.21	2.45 $\pm$ 0.43	0.55 $\pm$ 0.16
活动组	38	1.26 $\pm$ 0.18	2.53 $\pm$ 0.43	0.52 $\pm$ 0.13 ^{*#}
非活动组	14	1.38 $\pm$ 0.27	2.25 $\pm$ 0.41	0.64 $\pm$ 0.20
健康对照组	22	1.40 $\pm$ 0.29	2.28 $\pm$ 0.35	0.63 $\pm$ 0.17
<i>F</i>		2.963	3.898	4.875
<i>P</i>		0.058	0.025	0.01

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与非活动组相比, # $P < 0.05$

4. SLE 患者外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞与 Th17 细胞的比率及与疾病的相关性:SLE 组和对照组外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞与 Th17 细胞的比率分别为 0.55% $\pm$ 0.16%、0.63% $\pm$ 0.17%,两组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。其中在 SLE 患者中,活动组、非活动组外周血 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞与 Th17 细胞的比率分别为 0.52% $\pm$ 0.13%、0.64% $\pm$ 0.20%,两组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。活动组 SLE 患者与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$) (表 2)。SLE 患者 CD4⁺CD25^{high}Treg 细胞与 Th17 细胞的比率与 SLEDAI 呈负相关性 (*Pearson* 相关系数 r 为 -0.314, $P < 0.05$)。

讨 论

SLE 是累及多系统的一种常见的自身免疫性疾病,目前病因尚未完全明确。其发病机制主要是免疫调节异常,机体产生大量的自身抗体,导致抗原抗体复合物形成,沉积于器官引起相关的临床表现。现已明确表达 CD25 的 CD4⁺T 细胞具有免疫抑制作用,且能抑制炎症细胞的活化和细胞因子的分泌^[4]。但随着研究的不断深入,发现此群细胞也能“主动”地抑制自身反应性 T 细胞的免疫反应,具有调节免疫的平衡,因此,定义为调节性 T 细胞。最近发现多箭头转录因子 Foxp3 是小鼠 Treg 的标志物和功能调节基因,然而,在人活化的 T 细胞中也能短暂表达 Foxp3,说明 Foxp3 并不是人 Treg 的特异标志物,至今为止,CD4⁺CD25^{high}T 细胞仍是人 Treg 较特异的标志物^[5-7]。Th17 细胞是新近发现的 CD4⁺T 细胞亚群,

能分泌 IL-17A、IL-17F 及 IL-21,其在体外由 TGF- β 和 IL-6 诱导产生,维甲酸孤儿核受体 ROR γ t 是 Th17 细胞分化的重要因子^[2]。Treg 和 Th17 细胞在自身免疫性疾病中的作用越来越受到重视。

本研究首先发现 Treg 在 SLE 中的比例并不降低,且与疾病活动无相关。已有研究发现在活动性 SLE 患者外周血 Treg 的数目减少,相反的,也有研究发现活动性 SLE 患者的 Treg 是上升的,以上结果提示 Treg 在 SLE 中的作用不尽一致,可能与 Treg 的标志物选择有关^[8-10]。接着我们分析 SLE 患者外周血 Th17 细胞的比例,同样未发现具有临床意义。Wong 等^[11]发现 SLE 患者 Th17 细胞在活动期明显增加,并与 SLEDAI 呈正相关。最近的研究发现 Th17 细胞在 SLE 中有一定的作用,但是确切机制尚不明确^[12]。

本研究中的重要发现是活动性 SLE 患者存在 Treg 和 Th17 细胞的免疫失衡,与疾病活动呈负相关。国内学者 Yang 等^[13]也发现活动性 SLE 患者及 MRL/lpr 狼疮小鼠均存在 Th17 细胞的扩增,且伴随 Treg 的下降,同样最近的研究发现经治疗后临床缓解的活动性 SLE 患者的 SLEDAI 明显下降,伴随 Treg 和 Th17 细胞的失衡被逆转,以上结果表明 Treg 与 Th17 细胞的免疫失衡是活动性 SLE 的临床特征和参与 SLE 的发生和发展^[14]。然而导致 SLE 的 Treg 与 Th17 细胞失衡的原因尚未完全阐明,可能与活动性 SLE 的异常细胞因子的环境有关。例如,促炎症细胞因子 IL-6,已有研究发现 IL-6 抑制 TGF- β 诱导产生 Treg 和 Foxp3 的表达,也能抑制 Treg 的功能,最近的研究发现 TGF- β 联合 IL-6 能诱导产生 Th17 细胞^[2,14]。相反的是,IL-2 在 Treg 的诱导和功能维持中起到极其重要的角色,同样的是 IL-2 也能抑制 Th17 细胞的分化。因此,异常的 IL-6 和 IL-2 水平可能导致 Treg 与 Th17 细胞免疫失衡的重要因素,有待进一步研究。

综上所述,笔者发现活动性 SLE 患者存在 Treg 与 Th17 细胞的比率降低,提示两群细胞间的免疫失衡在 SLE 发生和发展中起到重要的作用。同时还发现 Treg 与 Th17 细胞比率与疾病活动呈明显相关性,可辅助作为判断疾病活动的指标。更重要的是,本研究的结果提示通过直接输注 Treg 或抑制 Th17 细胞分化来纠正免疫失衡是治疗 SLE 等自身免疫性疾病的新策略。

参考文献

- 1 Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(4):345-352
- 2 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages [J]. *Nat Immunol*, 2005, 6(11):1123-1132
- 3 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells [J]. *Nature*, 2006, 441(7090):235-238
- 4 Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function [J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30:531-564
- 5 Song X, Li B, Xiao Y, *et al.* Structural and biological features of Foxp3 dimerization relevant to regulatory T cell function [J]. *Cell Reports*, 2012, 1(6):665-675
- 6 Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4⁺ FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor- β dependent but does not confer a regulatory phenotype [J]. *Blood*, 2007, 110(8):2983-2990
- 7 Peters JH, Hilbrands LB, Koenen HJPM, *et al.* Ex Vivo generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4^{pos} CD25^{high} T cells for immunotherapy [J]. *PLoS One*, 2008, 3(5):e2233
- 8 Valencia X, Yarboro C, Illei G, *et al.* Deficient CD4⁺ CD25^{high} T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol*, 2007, 178(4):2579-2588
- 9 Mellor-Pita S, Citores MJ, Castejon R, *et al.* Decrease of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(4):553-554
- 10 Bonelli M, von Dalwigk K, Savitskaya A, *et al.* Foxp3 expression in CD4⁺ T cells of patients with systemic lupus erythematosus (SLE): A comparative phenotypic analysis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2008, 67(5):664-671
- 11 Wong CK, Lit LC, Tam LS, *et al.* Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity [J]. *Clin Immunol*, 2008, 127(3):385-393
- 12 Wan S, Xia C, Morel L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4⁺ CD25⁺ T cell regulatory functions [J]. *J Immunol*, 2007, 178(1):271-279
- 13 Yang J, Chu Y, Yang X, *et al.* Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(5):1472-1483
- 14 Ma J, Yu J, Tao X, *et al.* The imbalance between regulatory and IL-17-secreting CD4⁺ T cells in lupus patients [J]. *Clin Rheumatol*, 2010, 29(11):1251-1258

(收稿日期:2012-07-24)

(修回日期:2012-09-12)