

阿弗他溃疡患者锌水平与 T 淋巴细胞亚群的关系研究

陈晓涛 王紫莹 库尔班·吾甫尔 张 森

摘要 目的 分析复发性阿弗他溃疡(recurrent aphthous ulcer, RAU)患者血清锌水平、T淋巴细胞亚群之间的关系。方法 收集2016年1月~2020年2月在笔者医院口腔科诊断为RAU的患者115例作为观察组,同期选择60例无口腔溃疡就诊患者作为对照组,采用比色法检测锌水平,流式细胞术检测CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞数量及CD4⁺/CD8⁺比值。采用*t*检验比较两组指标之间的差异;方差膨胀因子诊断法排除具有共线性的指标,Logistic回归模型分析各指标在RAU患者中的危险程度。结果 RAU组与对照组血清锌、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺水平比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。多因素Logistic回归分析显示,年龄、血清锌、CD4⁺为RAU发病的独立危险因素($P < 0.05$)。结论 RAU患者中血清锌减少、T淋巴细胞亚群水平下降;二者之间相关性有待于进一步明确。

关键词 复发性阿弗他溃疡 血清锌 T淋巴细胞亚群

中图分类号 R78

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.12.009

Relationship between Zinc Level and T Lymphocyte Subsets in RAU Patients. Chen Xiaotao, Wang Ziyang, Kuerban · Wufuer, et al. Department of Stomatology, The People's Hospital of the Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830001, China

Abstract Objective To analyze the relationship between serum zinc levels and T lymphocyte subsets in patients with recurrent aphthous ulcer (RAU). **Methods** From January 2016 to February 2020, 115 patients diagnosed with RAU in our department of stomatology were selected as the observation group, and 60 patients without oral ulcers were selected as the control group. Colorimetric method was used to detect zinc level. Flow cytometry was used to detect the number of CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ cells and the ratio of CD4⁺/CD8⁺. The *t* test was used to compare the differences between the two groups of indicators, the variance inflation factor to exclude indicators with collinearity, and the Logistic regression model was used to analyze the risk of each indicator in RAU patients. **Results** Compared with the control group, the levels of serum zinc, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ in the RAU group were statistically different ($P < 0.05$). Multivariate Logistic regression analysis showed that age, serum zinc, and CD4⁺ were independent risk factors for the incidence of RAU ($P < 0.05$). **Conclusion** Serum zinc is reduced and T lymphocyte subset levels are reduced in RAU patients. The correlation between the two needs to be further studied.

Key words Recurrent aphthous ulcer; Serum zinc; T lymphocyte subsets

复发性阿弗他溃疡(recurrent aphthous ulcer, RAU)是一种常见的口腔黏膜疾病,2017年数据显示,我国复发性阿弗他溃疡发生率为27.17%^[1]。临床呈典型“红、黄、凹、痛”表现,因进食、口腔卫生下降而影响患者生活质量。RAU发病与微量元素缺乏有关。锌是人体不可缺少的微量元素之一。锌通过抑制T细胞在口腔黏膜积累、阻止IV型胶原蛋白裂解,加快伤口愈合,在维持上皮、黏膜基底完整中发挥重要防御作用^[2-4]。锌与机体免疫系统功能也密切相关,其通过促使前T细胞凋亡、胸腺素活性降

低,致成熟T细胞数量下降;锌上调叉头状转录因子(Foxp3)、锌指蛋白转录因子-10(KLF-10)表达,下调干扰调节因子-1(IRF-1)表达,诱导CD4⁺、CD25⁺、Foxp3⁺数量的增加及稳定,增强免疫细胞功能,对免疫细胞造成影响^[5-7]。在RAU发病过程中锌与T淋巴细胞亚群的关系尚不明确。本研究旨在分析RAU患者血清锌水平与T淋巴细胞亚群之间的相关性。

资料与方法

1. 一般资料:收集2016年1月~2020年2月在新疆维吾尔自治区人民医院口腔科诊断为复发性阿弗他溃疡患者115例。其中男性38例,女性77例,患者年龄20~79岁,平均年龄为44.9±15.0岁。另选同期60例口腔黏膜正常者作为对照组,其中男性18例,女性42例,患者年龄20~85

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81660185)

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院口腔科(陈晓涛、张森);830001 乌鲁木齐,新疆医科大学(王紫莹、库尔班·吾甫尔)

通讯作者:陈晓涛,电子邮箱:xiaotaochen@163.com

岁,平均年龄为 48.8 ± 15.6 岁。两组年龄及性别比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。该研究经笔者医院医学伦理学委员会通过,两组人员知情同意并签署知情同意书。

2. 纳入标准:参照《复发性阿弗他溃疡诊疗指南(试行)》相关诊断标准:①反复发作、病程 10 ~ 14 天、可自愈;②溃疡周围红晕,上覆假膜,病损处中央凹陷,疼痛,数目 ≤ 10 ,直径 5 ~ 10mm,边缘整齐;③对照组选择同期于笔者医院进行检查的健康者,排除 RAU 史^[8]。

3. 排除标准:①具有全身系统性疾病,如心脏病、肾功能不全、免疫性系统疾病、精神疾病者;②近 1 个月服用过抗生素、糖皮质激素类药物。

4. 样本收集及检测:受试对象血清锌检测:清晨空腹抽取静脉血 5ml,采用日本日立 LST008AS 全自动生化分析仪,进行比色法检测锌含量。T 淋巴细胞亚群检测:清晨空腹抽取静脉血 2ml,EDTA 抗凝,免疫荧光染色、固定,不超过 6h,标记后细胞上机不超过 72h。T 淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺ 及 CD8⁺ 细胞的检测均采用美国 BD 公司的多色流式细胞仪 FACS Calibur,所用抗体及试剂均购自同一厂家并严格按照说明操作。

5. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组血清锌、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 数量及 CD4⁺/CD8⁺ 比值之间比较采用 t 检验;方差膨胀因子诊断法排除具有共线性的指标,用 Logistic 回归模型对各指标与 RAU 之间的关系进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 两组血清锌及 T 淋巴细胞亚群水平比较:观察组中男性及女性患者的血清锌水平明显低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);两组中男性血清锌水平高于女性,差异无统计学意义(表 1)。RAU 患者外周血中 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ 数量均低于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);CD4⁺/CD8⁺ 比值两组间比较,差异无统计学意义(表 2)。

表 1 RAU 患者与口腔黏膜健康组血清锌表达水平比较 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$)

| 血清锌 | 观察组 | 对照组 | t | P |
|-----|-----------------|------------------|-------|-------|
| 男性 | 99.2 ± 22.3 | 112.8 ± 21.9 | 2.144 | 0.037 |
| 女性 | 95.7 ± 16.4 | 103.7 ± 19.7 | 2.336 | 0.021 |

表 2 RAU 患者与口腔黏膜健康组 T 淋巴细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s, \text{个/微升}$)

| 指标 | 观察组 | 对照组 | t | P |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|-------|-------|
| CD3 ⁺ | 1210.3 ± 385.1 | 1413.2 ± 440.0 | 3.148 | 0.002 |
| CD4 ⁺ | 645.3 ± 219.1 | 739.4 ± 245.1 | 2.586 | 0.011 |
| CD8 ⁺ | 529.6 ± 212.9 | 607.6 ± 261.9 | 2.122 | 0.035 |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 1.35 ± 0.55 | 1.34 ± 0.53 | 0.142 | 0.887 |

2. RAU 患者与健康者各相关指标共线性分析:各项指标中 CD3⁺ 方差膨胀系数 (VIF) ≥ 10 ,具有共线性予以排除,其余各指标 VIF < 10 ,予以纳入,详见表 3。

表 3 RAU 患者与健康者相关指标共线性分析

| 指标 | 共线性统计量 | |
|------------------------------------|--------|--------|
| | 容差 | VIF |
| 年龄 | 0.897 | 1.115 |
| 性别 | 0.956 | 1.046 |
| 血清锌 ($\mu\text{mol/L}$) | 0.990 | 1.010 |
| CD3 ⁺ (个/微升) | 0.095 | 10.526 |
| CD4 ⁺ (个/微升) | 0.292 | 3.429 |
| CD8 ⁺ (个/微升) | 0.229 | 4.369 |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 0.233 | 4.296 |

3. 年龄、性别、血清锌水平、CD4⁺、CD8⁺ 数量与 RAU 关系的 Logistic 回归分析结果:通过单因素分析发现,观察组中血清锌、CD4⁺、CD8⁺ 水平与对照组比较,差异有统计学意义。进一步将各指标、年龄、性别作为自变量,是否诊断为 RAU 患者作为因变量进行 Logistic 回归分析,结果显示年龄、血清锌和 CD4⁺ 是 RAU 发病的独立危险因素 ($P < 0.05$),其余指标差异均无统计学意义,详见表 4。

表 4 RAU 患者年龄、性别、血清锌、CD4⁺、CD8⁺ Logistic 回归分析

| 指标 | β | P | EXP(β) | 95% CI |
|---------------------------|---------|-------|----------------|---------------|
| 年龄 | 0.024 | 0.04 | 1.024 | 1.009 ~ 1.045 |
| 性别 | -0.087 | 0.818 | 0.917 | 0.437 ~ 1.923 |
| 血清锌 ($\mu\text{mol/L}$) | 0.026 | 0.004 | 1.026 | 1.009 ~ 1.045 |
| CD4 ⁺ (个/微升) | 0.002 | 0.044 | 1.002 | 1.000 ~ 1.003 |
| CD8 ⁺ (个/微升) | 0.001 | 0.171 | 1.001 | 1.000 ~ 1.003 |

讨 论

复发性阿弗他溃疡又称复发性口腔溃疡,临床上可分为轻型、重型(腺周口疮)及疱疹型。其中轻型阿弗他溃疡所占比例可高达 75% ~ 85%,主要表现为数目 < 10 个,直径 5 ~ 10mm,病程 10 ~ 14 天

为主^[9]。RAU患者其发病主要由各种局部及系统性因素共同作用,目前对RAU的病因尚未得到全面了解。

除已证实的免疫因素外,微量元素缺乏也是导致RAU发病的原因之一^[10]。锌在细胞免疫功能中的作用至关重要,它是超过3000种人类蛋白质的辅助因子,至少300种酶、1000个转录因子需要锌才能发挥其作用。锌不仅调节细胞介导的免疫力,还可抗氧化、抗炎、抗病毒活性,锌缺乏与人类疾病的发病机制密切相关^[11]。Bao等^[3]研究表明在口腔黏膜类疾病中,患者总缺锌率为19.0%,其中口腔溃疡患者的缺锌率可达21.2%。调查显示在胃溃疡、十二指肠球部溃疡患者中男性占72.2%、81.7%,明显高于女性的27.8%、18.3%,猜测是否由于不同性别患者体内锌元素水平不同所致溃疡发生率不同;但在本研究中溃疡组及口腔黏膜健康组男性血清锌水平均高于女性,但差异无统计学意义^[12]。

锌可以维持基膜完整,具有有效的抗溃疡作用^[2,3]。在胃溃疡大鼠模型中,锌可发挥降低氧化应激、减轻炎症的作用,从而促进胃黏膜溃疡愈合;锌制剂的补充对糖尿病足溃疡伤口愈合和代谢状态也有明显改善^[13,14]。Mehdipour等^[4]在治疗溃疡性口炎时发现,在伤口愈合过程中使用含锌漱口水与口腔溃疡的传统治疗方式一样有效。另有研究证实,使用锌制剂治疗RAU可得到良好的愈合,提示锌的缺乏可能与RAU发病有关^[15]。本研究发现,RAU患者体内血清锌水平明显低于健康人群,这与国内外大多数研究结果一致,支持RAU的发病与锌缺乏密切相关^[16,17]。

锌元素轻度或中度缺乏可削弱免疫力,延缓伤口愈合,引起炎症细胞因子的产生并增加氧化应激。缺乏锌的症状包括感染、性腺功能减退、皮肤炎和伤口愈合延迟等。免疫细胞对缺锌的反应更加敏感,锌的缺乏可至胸腺萎缩、淋巴细胞减少,尤其是CD4⁺T辅助细胞数量减少,导致CD4⁺/CD8⁺比率降低^[5]。本研究通过比较两组T淋巴细胞亚群发现,RAU患者外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺水平均低于健康人群,说明RAU的发病与细胞免疫降低相关。排除共线性,进行Logistic回归分析发现,年龄、锌元素和CD4⁺可作为RAU发病的独立危险因素,与以往研究结果显示外周血中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺是RAU的独立危险因素不一致^[18]。分析原因可能与本研究所选观察对象多为轻型RAU、病例典型性不够、样本量相对较

少有关。

动物实验结果缺锌大鼠模型中,脾脏细胞毒性T淋巴细胞CD3⁺、CD8⁺数量显著降低,而辅助性T淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺差异无统计学意义,认为锌缺乏导致细胞毒性T淋巴细胞CD3⁺、CD8⁺减少,但对辅助性T淋巴细胞CD3⁺、CD4⁺影响不显著^[19]。Iovino等^[20]研究发现,临床患者口服大剂量锌补充剂可使幼稚淋巴细胞CD4⁺显著增加,从而利于造血干细胞移植后的免疫重建,多项研究结果提示机体免疫的复杂性。细胞免疫用于维持机体的正常功能,当其功能发生紊乱时,可导致感染或自身免疫性疾病的发生。有研究表明,锌缺乏与机体内细胞免疫功能密切相关,但锌水平的升高或降低是否能引起CD3⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺的改变尚缺乏大样本可靠的临床证据^[21]。

综上所述,本研究显示RAU患者的血清锌、CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺水平显著低于健康者,且年龄、血清锌及CD4⁺可作为RAU的独立危险因素。故检测血清锌水平及CD4⁺数量可在临床中作为RAU的诊断参考;提示通过补充锌元素辅助RAU治疗。RAU的发病与细胞免疫降低、锌缺乏有关。后期尚需扩大样本量,选择不同类型病例做进一步研究。

参考文献

- Rivera C. Essentials of recurrent aphthous stomatitis[J]. Biome Rep, 2019, 11(2): 47-50
- Chaitanya NC, Chintada S, Kandi P, et al. Zinc therapy in treatment of symptomatic oral lichen planu[J]. Indian Dermatol Online J, 2019, 10(2): 174-177
- Bao ZX, Yang XW, Shi J, et al. Serum zinc levels in 368 patients with oral mucosal diseases: a preliminary study[J]. Med Oral Patol Oraly Cirug Bucal, 2016, 21(3): e335-e340
- Mehdipour M, Taghavi Zenooz A. A comparison of the effect of triamcinolone ointment and mouthwash with or without zinc on the healing process of aphthous stomatitis lesions[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2016, 10(2): 88-91
- Maywald M, Wessels I. Zinc signals and immunity[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10): 2222
- Maares M, Haase H. Zinc and immunity: an essential interrelation[J]. Arch Biochemi Biophys, 2016, 611: 58-65
- Maywald M, Rink L. Zinc supplementation induces CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ antigenspecific regulatory T cells and suppresses IFN γ production by upregulation of Foxp3 and KLF10 and down regulation of IRF-1[J]. Eur J Nutr, 2017, 56(5): 1859-1869
- 周刚. 复发性阿弗他溃疡诊疗指南(试行)[J]. 中华口腔医学杂志, 2012, 47(7): 402-404
- 陈谦明. 口腔黏膜病学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2012: 64-68

- cotarget, 2016, 7(50): 82411 – 82423
- 3 Reifenger G, Wirsching HG, Knobbe – Thomsen CB, *et al.* Advances in the molecular genetics of gliomas – implications for classification and therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(7): 434 – 452
 - 4 Tang X, Xu P, Wang B, *et al.* Identification of a specific gene module for predicting prognosis in glioblastoma patients[J]. *Front Oncol* 2019, 9: 812
 - 5 Chen R, Smith – Cohn M, Cohen AL, *et al.* Glioma subclassifications and their clinical significance[J]. *Neurotherapeutics*, 2017, 14(2): 284 – 297
 - 6 Chang WC, Cheng WC, Cheng BH, *et al.* Mitochondrial Acetyl – CoA synthetase 3 is biosignature of gastric cancer progression [J]. *Cancer Med – Us*, 2018, 7(4): 1240 – 1252
 - 7 Bowman RL, Wang QH, Carro A, *et al.* GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets[J]. *Neuro – Oncology*, 2017, 19(1): 139 – 141
 - 8 Madhavan S, Zenklusen JC, Kotliarov Y, *et al.* Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research[J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(2): 157 – 167
 - 9 Gravendeel LAM, Kouwenhoven MCM, Gevaert O, *et al.* Intrinsic gene expression profiles of gliomas are a better predictor of survival than histology[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(23): 9065 – 9072
 - 10 Yuan HT, Yan M, Zhang GX, *et al.* CancerSEA: a cancer single – cell state atlas[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D900 – D908
 - 11 Li JJ, Shen JY, Wang Z, *et al.* ELTD1 facilitates glioma proliferation, migration and invasion by activating JAK/STAT3/HIF – 1 alpha signaling axis[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13904
 - 12 Lapointe S, Perry A, Butowski NA. Primary brain tumours in adults [J]. *Lancet*, 2018, 392(10145): 432 – 446
 - 13 Sun T, Jiao L, Wang Y, *et al.* SIRT1 induces epithelial – mesenchymal transition by promoting autophagic degradation of E – cadherin in melanoma cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 136
 - 14 Liu H, Ma Y, He HW, *et al.* SPHK1 (sphingosine kinase 1) induces epithelial – mesenchymal transition by promoting the autophagy – linked lysosomal degradation of CDH1/E – cadherin in hepatoma cells[J]. *Autophagy*, 2017, 13(5): 900 – 913
 - 15 Paw I, Carpenter RC, Watabe K, *et al.* Mechanisms regulating glioma invasion[J]. *Cancer Lett*, 2015, 362(1): 1 – 7
 - 16 Liang W, Guo B, Ye J, *et al.* Vasorin stimulates malignant progression and angiogenesis in glioma [J]. *Cancer Sci*, 2019, 110(8): 2558 – 2572
 - 17 Chen X, Yang F, Zhang T, *et al.* MiR – 9 promotes tumorigenesis and angiogenesis and is activated by MYC and OCT4 in human glioma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 99
 - 18 Renfrow JJ, Soike MH, Debinski W, *et al.* Hypoxia – inducible factor 2 α : a novel target in gliomas[J]. *Future Med Chem*, 2018, 10(18): 2227 – 2236
 - 19 Jawhari S, Ratinaud MH, Verdier M. Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival – prone ‘ménage – à – trois’ [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(10): e2434
- (收稿日期: 2020 – 05 – 09)
(修回日期: 2020 – 06 – 29)
-
- (上接第 35 页)
- 10 Nan J, Liang L, Li L. Soluble programmed death – 1 and soluble programmed death ligand 1 protein expression and immune status in patients with recurrent aphthous ulcer [J]. *Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi*, 2017, 35(3): 286 – 290
 - 11 Read SA, Obeid S, Ahlenstiel C, *et al.* The role of zinc in antiviral immunity[J]. *Adv Nutr*, 2019, 10(4): 696 – 710
 - 12 庞惠玲, 何赛琴. 2006 – 2009 年胃溃疡及十二指肠球部溃疡内镜检查结果调查 [J]. *中国内镜杂志*, 2010, 16(11): 1186 – 1188
 - 13 Yang H, Lu Y, Zeng XF. Antichronic gastric ulcer effect of zinc – baicalin complex on the acetic acid – induced chronic gastric ulcer rat mode[J]. *Gastroenterol Res Prac*, 2018, 2018: 1275486
 - 14 Momen – Heravi M, Barahimi E. The effects of zinc supplementation on wound healing and metabolic status in patients with diabetic foot ulcer: a randomized, double – blind, placebo – controlled trial[J]. *Wound Repair Regen*, 2017, 25(3): 512 – 520
 - 15 党如意, 田国才, 陈玲. 锌剂治疗复发性口腔溃疡疗效的 Meta 分析[J]. *实用口腔医学杂志*, 2018, 34(2): 230 – 233
 - 16 Yıldırım N, Özalp Ö. Recurrent aphthous stomatitis as a result of zinc deficiency[J]. *Oral Health Prev Dent*, 2019, 17(5): 465 – 468
 - 17 茅海东, 程剑, 石炜. 血清锌含量与复发性口腔溃疡及味觉的相关性研究[J]. *口腔医学*, 2015, 35(6): 452 – 455
 - 18 李琪薇, 牛为东, 陈盈颖, 等. 铁代谢水平及淋巴细胞水平变化对口腔溃疡患者病情发生发展的影响[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(9): 4252 – 4256
 - 19 Kido T, Ishiwata K. Inflammatory response under zinc deficiency is exacerbated by dysfunction of the Th2 lymphocyte – M2 macrophage pathway[J]. *Immunology*, 2019, 156(4): 356 – 372
 - 20 Iovino L, Mazziotta F. High – dose zinc oral supplementation after stem cell transplantation causes an increase of TRECs and CD4⁺ naïve lymphocytes and prevents TTV reactivation [J]. *Leuk Res*, 2018, 70: 20 – 24
 - 21 Bonaventura P, Benedetti G, Albareda F. Zinc and its role in immunity and inflammation[J]. *Autoimmun Rev*, 2015, 14(4): 277 – 285
- (收稿日期: 2020 – 05 – 20)
(修回日期: 2020 – 06 – 19)