

系统性红斑狼疮患者外周血 T 淋巴细胞膜分子检测分析

邹立新, 焦 鑫, 李清明, 何思春, 王利君, 魏中华 (四川省达州市中心医院检验科 635000)

【摘要】 目的 研究系统性红斑狼疮(SLE)患者外周血 CD4、CD25 以及 CD30 3 种表面抗原的表达与 SLE 疾病活动性的相关性。**方法** 运用流式细胞仪采用三色荧光标记分析 SLE 患者外周血单个核细胞(PBMC)的 CD4、CD25 及 CD30 3 种表面抗原的表达。用系统性红斑狼疮病情活动记分(SLE DAI)标准评分来判断 SLE 疾病活动性。**结果** SLE 患者 PBMC 中 CD4⁺ 细胞较健康对照组显著减少, CD4⁺CD25⁺ 细胞的百分率较健康对照组显著增高, 两组几乎均无 CD4⁺CD30⁺ 细胞表达, 也未见 CD4⁻CD30⁺ 细胞。**结论** SLE 患者 CD4⁺CD25⁺ 细胞阳性率与疾病的活动性显著相关。

【关键词】 系统性红斑狼疮; CD4⁺CD25⁺T 淋巴细胞; 系统性红斑狼疮病情活动记分

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.24.019 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)24-3076-02

Analysis of peripheral blood T cells membrane molecule in the patients with systemic lupus erythematosus ZOU li-xin, JIAO xin, LI qing-ming, HE Si-chun, WANG li-jun, WEI Zhong-hua (Department of Clinical Laboratory, The Central Hospital of Dazhou City, Sichuan 635000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of peripheral blood CD4⁺, CD25⁺ and CD30⁺ T cells of the patients with systemic lupus erythematosus and its clinical significance. **Methods** The expressions of peripheral blood CD4⁺, CD25⁺ and CD30⁺ T cells were measured by using three-color flow cytometric analysis, and the disease activity in patients with SLE was estimated by SLE DAI. **Results** The percentages of CD4⁺ T cells of the patients with SLE were lower than controls, but the percentages of CD4⁺CD25⁺ T cells were significantly increased in SLE groups compared with controls. There were few CD4⁺CD30⁺ and CD4⁻CD30⁺ T cells in both groups. **Conclusion** The percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells is probably closely related to the disease activity in patients with SLE.

【Key words】 systemic lupus erythematosus; CD⁺CD25⁺T cell; SLE DAI

系统性红斑狼疮(SLE)患者免疫系统的主要异常是依赖于 T 淋巴细胞的 B 细胞功能亢进, 产生大量的自身抗体和免疫复合物^[1]。据产生的细胞因子的不同, 表达 CD4 分子的辅助性 T 淋巴细胞(Th)至少可分为 3 种亚型: Th1 细胞主要生成白细胞介素-2(IL-2)、干扰素-γ 和肿瘤坏死因子-α; Th2 细胞主要生成 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10; Th0 细胞可生成两类细胞因子^[2]。本实验运用流式细胞仪采用三色荧光标记分析 SLE 患者外周血单个核细胞(PBMC)的 CD4、CD25 以及 CD30 3 种表面抗原的表达, 通过这些表面标记反映 SLE 患者外周血 Th 细胞数量的变化、激活状态以及活化细胞是否分泌 Th2 细胞因子, 并探讨这些 T 淋巴细胞膜分子表达与 SLE 疾病活动性的相关性。

1 资料与方法

1.1 临床资料 28 例 SLE 患者男 1 例, 女 27 例, 年龄 16~59 岁, 根据 ACR 标准确定诊断^[3], 患者均未合并炎症感染。其中 10 例患者已接受激素治疗(口服强的松 1~2 mg/kg·d), 18 例患者尚未接受任何治疗。50 例健康献血者作为健康对照组, 男 2 例, 女 48 例, 年龄 22~57 岁。

1.2 试剂与仪器 红蛋白(PE)标记的小鼠抗人 CD25 单克隆抗体、Cy-chrom 标记的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD30 单克隆抗体, 购自 PharMingen 公司。仪器采用 FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson)。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 取肘静脉血(肝素抗凝)在 4 h 内进行分

析。用 Ficoll-Hypaque 淋巴细胞分离液(pharmacia)离心分层, 取出中间层的 PBMC 置于 5 mL Falcon 试管, 每管的 100 μL 细胞悬液中含大约 105 个细胞, 采用三色免疫荧光染色。

1.3.2 细胞染色 20 μL 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗人 CD30 单克隆抗体、20 μL 藻红蛋白(PE)标记的小鼠抗人 CD25 单克隆抗体和 20 μL Cy-chrom 标记的小鼠抗人 CD4 单克隆抗体分别加入待测试管, 以相应标记的小鼠 IgG 亚型抗体作为阴性对照。试管置于 4 ℃ 暗处反应 30 min 后用磷酸盐缓冲液(PBS, pH=7.4, 含 1%叠氮钠和 0.5%清蛋白)清洗离心, 吸去上清液后用 300 μL 1%多聚甲醛固定待测。

1.3.3 流式细胞仪分析 采用 FACScan 流式细胞仪(Becton Dickinson)进行细胞表面抗原分析, 仪器提供前向散射光(FSC), 侧向散射光(SSC)以及不同波长的荧光(FL1、FL2、FL3)等参数, 在 FSC-SSC 二维点图上确定出淋巴细胞的分布, 随后在 FL1-FL2 及 FL2-FL3 二维点图上进行细胞各表面标记的分析, 每份标本分析 10 000 个细胞。

1.4 系统性红斑狼疮病情活动记分(SLE DAI)评分 SLE 疾病活动性运用 SLE DAI 标准评分^[4]来判断。中枢神经系统表现(癫痫、精神病、器质性脑病、视觉障碍、颅神经病变、狼疮性头痛、脑血管意外)各计 8 分, 血管炎计 8 分, 关节炎和肌炎各计 4 分, 肾脏表现(管型尿、血尿、蛋白尿、脓尿)各计 4 分, 新发皮疹、脱发和黏膜溃疡各计 2 分, 胸膜炎和心包炎各计 2 分, 低补体血症和 DNA 结合率增高各计 2 分, 发热、血小板减少和白细胞减少性血症各计 1 分, 总分 105 分。

1.5 统计学处理 分别计算 SLE 患者组与健康对照组细胞

阳性率的中间值,下 25%至上 25%的区间值用以反映变化范围,运用 Mann-Whitney 检验进行 SLE 组与对照组的表面抗原比较;运用 Spearman 检验进行表面抗原与疾病活动性 SLE DAI 评分的相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞表面抗原表达 病例组及健康对照组的血液标本在采集后及时加以染色分析以尽可能反映细胞在体内的状况。SLE 患者标本的流式细胞仪分析图谱 FL1~FL3 和 FL2~FL3 二维点图显示单个细胞水平上淋巴细胞的 3 种表面抗原的表达。经统计学分析 SLE 患者 PBMC 中 $CD4^+$ 细胞较健康对照组显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$),二者的中间值分别为 38.2%和 31.9%。SLE 组 $CD4^+CD25^+$ 细胞的百分率中间值为 9.6%,较健康对照组 6.9%显著增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。健康对照组与 SLE 组的 PBMC 几乎均无 $CD4^+CD30^+$ 细胞表达,也未见 $CD4^-CD30^+$ 细胞。

2.2 SLE DAI 评分 28 例 SLE 患者中,21 例伴有肾脏病变,21 例伴有关节炎和/或肌炎,23 例伴低补体血症和/或 DNA 结合率增高,16 例有皮疹和(或)脱发和(或)黏膜溃疡,17 例伴发热,15 例外周血中血小板减少和/或白细胞减少,12 例伴有胸膜炎和/或心包炎,5 例合并血管炎,3 例合并中枢神经系统病变。患者的临床疾病活动性 SLE DAI 评分范围为 14~38 分,中间值为 24 分。

2.3 相关性分析 SLE 患者 $CD4^+CD25^+$ 细胞阳性率与患者 SLE DAI 的评分有显著的相关性($r=0.4688$, $P<0.05$), $CD4^+$ 细胞阳性率与 SLE DAI 无显著相关性($r=0.1166$, $P>0.05$)。

3 讨 论

SLE 患者外周血中淋巴细胞亚群分布反映了机体免疫调节状态,其变化可以导致 SLE 的免疫异常。本研究结果显示,SLE 患者 $CD4^+$ T 淋巴细胞数目减少,这可能是 T 淋巴细胞反应性自身抗体作用的结果,免疫激活引起的细胞死亡也可能减少细胞数。 $CD25$ 是 IL-2 受体的 α 链,表达于活化的 T 淋巴细胞、B 细胞和单核细胞^[5], $CD4^+CD25^+$ 细胞表达显著增高,揭示 SLE 患者免疫系统处于高激活状态,它与疾病活动性间也存在显著相关性, $CD4^+CD25^+$ 细胞百分率可作为 SLE 活动性的标志之一。Wolf 等^[6]的研究报道 SLE 患者血清中可溶性 $CD25$ (sCD25)显著增高,并建议作为疾病进展的观察指标。

$CD30$ 是 TNF 受体超家族成员,表达于产生 Th2 型细胞因子的活化 Th 细胞表面^[7]。活化 T 淋巴细胞表达 $CD30$ 分子被认为是产生 Th2 型细胞因子的一类分化和/或活化 T 淋巴细胞的标志。Th2 细胞因子生成增多参与 SLE 的病理过程^[8-9],这些因子可以促进分泌自身抗体的 B 细胞的活化和分化^[10]。有研究显示 SLE 患者血清中可溶性 $CD30$ (sCD30)较健康对照组明显增高,而且与 SLE 的活动性相关^[11]。本研究结果显示, $CD4^+$ 细胞未表达 $CD30$, $CD4^-$ 细胞也无 $CD30$ 的表

达,可能是 $CD30$ 细胞表达局限于机体发生炎性病变的微环境中。

参考文献

- [1] Mills JA. Systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med,1994,330:1871-1879.
- [2] Romagnani S. Lymphokine production by human T cells in disease states[J]. Ann Rev Immunol,1994,12:227-257.
- [3] Tan EM,Cohen AS,Fries JF,et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum,1982,25:1271-1277.
- [4] Bombardier C,Gladman DD,Urowitz MB,et al. Derivation of the SL EDAI:a disease activity index for lupus patients[J]. Arthritis Rheum,1992,35:630-640.
- [5] Minami Y,Kono T,Miyazaki T,et al. The IL-2 receptor complex:its structure,function and target genes[J]. Ann Rev Immunol,1993,11:245-268.
- [6] Wolf RE,Brelsford WG. Soluble interleukin-2 receptors in systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Rheum,1988,31:729-735.
- [7] Del Prete G,De Carli M,Almerigogna F,et al. Preferential expression of $CD30$ by human $CD4^+$ T cells producing Th2-type cytokines[J]. FASEB J,1995,9:81-86.
- [8] Hagiwara E,Gourley MF,Lee S,et al. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10;interferon- γ -secreting cells in the peripheral blood[J]. Arthritis Rheum,1996,39:379-385.
- [9] Richand PY,Alcocer VJ,Llorente L. High levels of Th2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus[J]. Rev Invest Clin,1995,47:267-272.
- [10] Kitani A,Hara M,Hirose T,et al. Heterogeneity of B cell responsiveness to interleukin 4,interleukin 6 and low molecular weight B cell growth factor in discrete stages of B cell activation in patients with systemic lupus erythematosus[J]. Clin Exp Immunol,1989,77:31-36.
- [11] Caligaris-Cappio F,Bertero MT,Converso M,et al. Circulating levels of soluble $CD30$:a marker of cells producing Th2-type cytokines,are increased in patients with systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity[J]. Clin Exp Rheum,1995,13:339-343.

(收稿日期:2012-07-21)

作者声明

《检验医学与临床》杂志 2012 年 11 月出版的第 9 卷第 22 期 2843 页,题目为“厦门市部分职业人员血糖、血脂异常现状及其危险因素调查分析”一文的作者吴长蓉为通讯作者,特此声明!

第一作者:唐熟能