

• 论 著 •

HLA-B27 阳性类风湿关节炎和强直性 脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群分析*

赵 丹¹, 杨小猛^{2△}, 马文松³, 苏卓娃⁴

(1. 广东省深圳市罗湖区慢性病防治院检验科 518023; 2. 广东省深圳市罗湖区妇幼保健院
检验科 518019; 广东省深圳市南山区人民医院; 3. 中心实验室, 4. 骨科 518052)

摘 要:目的 探讨人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)阳性类风湿关节炎(RA)和强直性脊柱炎(AS)患者外周血 T 细胞亚群变化特点及其临床意义。方法 应用流式细胞术分析受试患者及健康者 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值。结果 HLA-B27 阳性 RA 患者 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞百分率低于健康对照组, CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值高于健康对照组。HLA-B27 阳性 I、II 级 AS 患者 CD4⁺ T 细胞百分率和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值低于健康对照组, CD8⁺ T 细胞百分率高于健康对照组; HLA-B27 阳性 III 级 AS 患者 3 项指标与健康对照组差异无统计学意义。HLA-B27 阳性 AS 各级患者 CD8⁺ T 细胞百分率和 III 级患者 CD4⁺ T 细胞百分率高于 HLA-B27 阳性 RA 患者, 各级患者 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值低于 HLA-B27 阳性 RA 患者。结论 外周免疫功能异常可能是 HLA-B27 阳性 RA 和 AS 发病机制之一, CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值有助于两者的鉴别诊断。

关键词:HLA 抗原; 关节炎, 类风湿; 脊柱炎, 强直性; T 淋巴细胞亚群
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.02.003 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2011)02-0150-02

T Cell Subsets in Peripheral Blood of HLA-B27 Positive Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis Patients

Zhao Dan¹, Yang Xiaomeng^{2△}, Ma Wensong³, Su Zhuowva⁴

(1. Department of Laboratory, Luohu Chronic Disease Prevention and Cure Hospital, Shenzhen, Guangdong 518023, China; 2. Department of Laboratory, Luohu Women and Children's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518019, China; 3. Department of Orthopaedics, Nanshan Hospital, Shenzhen, Guangdong 518052, China; 4. Central Laboratory, Nanshan Hospital, Shenzhen, Guangdong 518052, China)

Abstract:Objective To explore the changes and clinical significance of T cell subsets in peripheral blood of HLA-B27 positive rheumatoid arthritis(RA)and ankylosing spondylitis(AS) patients. **Methods** The ratio of CD4⁺ T/CD8⁺ T, and the percentages of CD4⁺ T and CD8⁺ T in peripheral blood were analyzed by flow cytometer. **Results** The percentage of CD4⁺ T and CD8⁺ T in HLA-B27 positive RA cases were lower than those in healthy controls, while the ratios of CD4⁺ T/CD8⁺ T increased. The percentages of CD4⁺ T and the ratio of CD4⁺ T/CD8⁺ T in HLA-B27 positive grade I and II AS cases were lower than in healthy controls, the percentage of CD4⁺ T was higher. Meanwhile, there were no significant differences of the percentage of CD4⁺ T, CD8⁺ T and the ratio of CD4⁺ T/CD8⁺ T between HLA-B27 positive grade III AS cases and healthy controls. The percentage of CD8⁺ T in all of HLA-B27 positive AS patients and the percentage of CD4⁺ T in grade III cases were higher and the ratio of CD4⁺ T/CD8⁺ T in all AS patients were lower than those in RA cases. **Conclusion** Dysfunction of periphery immune system may be involved in the immunopathogenesis of HLA-B27 positive RA and AS. The ratio of CD4⁺ T/CD8⁺ T is helpful for the antidiastole of the two diseases.

Key words:HLA antigens; arthritis, rheumatoid; spondylitis, ankylosing; T-lymphocyte subsets

强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)是一种慢性进行性自身免疫性疾病,发病机制尚未完全明确。以往将 AS 归为类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA),但两者发病机制、血清反应不同。AS 患者人类白细胞抗原 B27(human leukocyte antigen B27, HLA-B27)阳性率达 96%, HLA-B27 携带者患 AS 的相对危险度达 55~376,是 AS 辅助诊断指标之一,也可用于 AS 和 RA 的鉴别诊断,但部分 RA 患者 HLA-B27 为阳性^[1-3]。本研究采用流式细胞术分析 HLA-B27 阳性的 AS 和 RA 患者外周血 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率,探讨外周血 T 细胞亚群变化与疾病的关系及其临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 2003 年 7 月至 2005 年 6 月深圳市南山区人民医院收治的 HLA-B27 阳性 RA 和 AS 患者。AS 诊断及分

级标准参照文献[4-5]; RA 诊断标准参照文献[6]。所有患者均未服用柳氮磺胺嘧啶、甲氨喋呤等药物。AS 患者 55 例,男 39 例、女 16 例,中位年龄 28 岁; RA 患者 20 例,男 13 例、女 7 例,中位年龄 32 岁。健康对照组 30 例,男 21 例、女 9 例,中位年龄 30 岁。

1.2 主要试剂和仪器 抗 CD3-ECD 及同型对照为 IMMU-NOTECH 公司产品,抗 CD4-PE-Cy5、抗 CD8-PE-Cy5 及同型对照、HLA-B27 试剂盒为 BD 公司产品,流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品(型号:EPICS-XL)。

1.3 方法 抽取 AS 和 RA 患者及健康对照者肝素钠抗凝静脉血 1 mL。取 3 支试管,分别加入小鼠抗人单克隆 IgG1-ECD 和小鼠抗人单克隆 IgG1-Cy5(同型对照管)、抗 CD4-PE-Cy5 和抗 CD3-ECD(CD4⁺管)、抗 CD8-PE-Cy5 和抗 CD3-ECD(CD8⁺

* 基金项目:广东省深圳市科技计划基金资助项目(0410110780)。△ 通讯作者, E-mail: gdmcwsw@126.com。

管)各 10 μ L,再分别加入待测抗凝血 100 μ L,混匀,室温避光静置 20 min;加入 Optilyse C(含 1.5% 甲醛)500 μ L,室温避光静置 10 min;加入 PBS 500 μ L,室温避光静置 10 min,800 g 离心 5 min,弃上清,加入 500 μ L PBS,流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理 所有结果以($\bar{x} \pm s$)表示,两两比较采用 ANOVA 和 Dunnett-*t* 检验,统计软件为 SAS8.22, $P < 0.05$ 时差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HLA-B27 阳性 AS 患者组与健康对照组 T 细胞亚群比较 HLA-B27 阳性 AS 患者与健康对照组 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞检测结果见表 1。

表 1 HLA-B27 阳性 AS 患者与健康者外周血 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率比较[n 或 ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ T/ CD8 ⁺ T
健康对照组	30	39.96 $\pm$ 6.52	23.61 $\pm$ 4.31	1.55 $\pm$ 0.27
I 级 AS 组	19	32.51 $\pm$ 6.76 [#]	28.45 $\pm$ 5.72 [#]	1.14 $\pm$ 0.07 [#]
II 级 AS 组	21	31.26 $\pm$ 5.94 [#]	38.30 $\pm$ 1.44 [#]	0.82 $\pm$ 0.16 ^{#▽}
III 级 AS 组	15	40.01 $\pm$ 6.68 [*]	20.90 $\pm$ 0.81 [*]	1.72 $\pm$ 0.16 [*]

注:与健康对照组比较,[#] $P < 0.05$,^{*} $P > 0.05$;与 I 级 AS 组比较,[▽] $P < 0.05$ 。

2.2 HLA-B27 阳性 RA 患者组与健康对照组 T 细胞亚群比较 HLA-B27 阳性 RA 患者与健康对照组 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞检测结果见表 2。

表 2 HLA-B27 阳性 RA 患者与健康者外周血 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率比较[n 或 ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ T/ CD8 ⁺ T
健康对照组	30	39.96 $\pm$ 6.52	23.61 $\pm$ 4.31	1.55 $\pm$ 0.27
RA 组	20	33.53 $\pm$ 3.70 [#]	15.48 $\pm$ 2.38 [#]	2.37 $\pm$ 0.13 [#]

注:与健康对照组比较,[#] $P < 0.05$ 。

2.3 HLA-B27 阳性 AS 患者与 RA 患者 T 细胞亚群的比较 HLA-B27 阳性 RA 患者与 RA 患者 CD4⁺ T 细胞、CD8⁺ T 细胞检测结果见表 3。

表 3 HLA-B27 阳性 AS 患者及 RA 患者外周血 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞百分率比较[n 或 ($\bar{x} \pm s$)]

组别	<i>n</i>	CD4 ⁺ T 细胞	CD8 ⁺ T 细胞	CD4 ⁺ T/ CD8 ⁺ T
RA 组	20	33.53 $\pm$ 3.70	15.48 $\pm$ 2.38	2.37 $\pm$ 0.13
I 级 AS 组	19	32.51 $\pm$ 6.76	28.45 $\pm$ 5.72 [*]	1.14 $\pm$ 0.07 [*]
II 级 AS 组	21	31.26 $\pm$ 5.94	38.30 $\pm$ 1.44 [*]	0.82 $\pm$ 0.16 [*]
III 级 AS 组	15	40.01 $\pm$ 6.68 [*]	20.90 $\pm$ 0.81 [*]	1.72 $\pm$ 0.16 [*]

注:与 RA 组比较,^{*} $P < 0.05$ 。

3 讨 论

AS 与 RA 均以炎性关节炎为主要临床表现,但发病机制、血清反应不同^[7]。AS 患者 HLA-B27 阳性率高,类风湿因子(rheumatoid factor,RF)多为阴性;RA 患者 HLA-B27 多为阴性,RF 多为阳性^[8]。RA 很少累及骶髂关节,但合并骶髂关节改变者 HLA-B27 为阳性,RF 为阴性,放射学改变类似 AS 等血清阴性关节病的骶髂关节损害,但临床表现不相符,临床转归也不尽相同,给临床诊断和治疗带来困扰^[3]。

HLA-B27 是诊断 AS 和鉴别诊断 AS 及 RA 的重要实验室指标。对 HLA-B27 阴性的患者,临床医生结合其影像学改变不难做出诊断和鉴别诊断;但对 HLA-B27 阳性的患者,仅凭影像学检测有可能作出错误诊断。因此本研究选取 HLA-B27 阳性的 AS 和 RA 患者,探讨外周血 T 细胞亚群变化与疾

病的关系及其临床应用价值。

CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞的平衡与自身免疫性疾病的发生、发展密切相关^[9-10]。CD4⁺ T 细胞具有辅助、诱导细胞及体液免疫的作用;CD8⁺ T 细胞具有细胞毒效应,也发挥抑制细胞及体液免疫的作用。CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值变化反应机体免疫功能状况,比值升高表明免疫功能亢进,比值降低表明免疫功能低下。本研究发现,I、II 级 AS 患者 CD4⁺ T 细胞百分率和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值均低于健康对照组,CD8⁺ T 细胞百分率高于健康对照组,且这种免疫学变化随着病情的加重更显著,提示 I、II 级 AS 患者体内细胞及体液免疫减弱,即 HLA-B27 阳性 AS I、II 级患者外周免疫功能低下,不利于形成有效的自身耐受,机体免疫系统针对自身抗原可能产生自身免疫应答,导致疾病的发生、发展。本研究还发现,III 级 AS 组患者 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值与健康对照组相比均无变化,提示其外周免疫功能无异常,可能与患者炎性部位纤维化、钙化,机体对炎性部位免疫反应减弱有关。本研究中,HLA-B27 阳性 RA 患者 CD4⁺ T 和 CD8⁺ T 细胞百分率均低于健康对照组,而 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值高于健康对照组,提示此类患者外周免疫功能亢进,多种细胞因子和(或)抗体参与 RA 的发生、发展。

AS 有明显家族聚集现象,并与 HLA-B27 密切相关;HLA-B27 阳性者 AS 发病率为 7.3%,HLA-B27 阴性者发病率为 0.13%,HLA-B27 阳性者 AS 发病率比阴性者高 200~300 倍^[11-12]。尽管结合临床特征,HLA-B27 阳性对 AS 的诊断有较高特异性,但部分合并骶髂关节炎的 RA 患者也表现为阳性。RF 虽然对诊断 RA 有一定的价值,但没有特异性,且 RA 患者 RF 平均阳性率小于 80%^[13-14]。RF 阴性的 RA 与 AS(特别是早期 AS)临床特征相似,在 AS 和 RA 患者 HLA-B27 均为阳性时不能很好地加以鉴别。本研究发现 HLA-B27 阳性各级 AS 患者 CD8⁺ T 细胞百分率高于 RA 患者,各级 AS 患者 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值和 I、II 级 AS 患者 CD4⁺ T 百分率低于 HLA-B27 阳性 RA 患者,说明 AS 与 RA 患者外周免疫功能有很大差别。

本研究证实综合应用 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞和 CD4⁺ T/CD8⁺ T 比值,以及影像学检测,对 AS 与 RA 的鉴别诊断及 AS 病情分析等具有重要临床意义。

参考文献

[1] Khan MA. An overview of clinical spectrum and heterogeneity of spondyloarthropathies[J]. Rheum Dis Clin North Am, 1992, 18 (1): 1-10.

[2] 朱宇芳. 流式细胞术检测人类白细胞抗原-B27 在诊断强直性脊柱炎中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 735-736.

[3] 张琨, 蒋翔, 李辉. HLA-B27 阳性儿童类风湿关节炎的诊断与治疗[J]. 工企医刊, 2008, 21(2): 15-17.

[4] 吴恩惠. 医学影像诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 417.

[5] 吴丽. 强直性脊柱炎的影像学诊断研究[J]. 医药论坛杂志, 2008, 29(23): 79-80.

[6] 吕芳, 李兴福. 2010 年美国风湿病学会联合欧洲抗风湿病联盟的类风湿关节炎分类标准解读[J]. 诊断学理论与实践, 2010, 9(4): 307-310.

[7] Vliet Vlieland TP, Li LC. Rehabilitation in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis: differences and similarities[J]. Clin Exp Rheumatol, 2009, 27(4 Suppl 55): S171-178.

[8] 殷皓, 胡志刚, 袁劲松. 类风湿因子分型检测的(下转第 153 页)

2.2 血、尿 β 2M 与肾小管间质病变相关性分析 血、24 h 尿 β 2M 及尿 β 2M/TP 均随着肾小管间质损伤的加重而逐渐升高; ($>4\sim 7$) 分和 ($>7\sim 9$) 分组患者较 0 分和 ($>0\sim 4$) 分组患者, 3 种指标均有升高 ($P<0.05$)。Spearman 法双变量相关分析显示, 血、24 h 尿 β 2M 及尿 β 2M/TP 与肾小管间质病变存在正相关 ($P<0.05$), 相关系数分别为 0.579、0.398 和 0.277。以 2.2 mg/L 作为血 β 2M 临界值 (本院检验科该项目正常参考范围为 0.8~2.2 mg/L), 将 315 例患者分为小于 2.2 mg/L (135 例) 和大于或等于 2.2 mg/L (180 例) 亚组进行相关性分析, 发现当血 β 2M ≥ 2.2 mg/L 时, 血、尿 β 2M 和尿 β 2M/TP 与肾小管间质病变存在相关性 ($P<0.05$), 当血 β 2M < 2.2 mg/L 时相关性消失 ($P>0.05$), 但仍存在一定比例和不同程度的肾小管间质病变 [0 分 12.6%, ($>0\sim 4$) 分 77.0%, ($>4\sim 7$) 分 9.0%, ($>7\sim 9$) 分 1.4%]。

3 讨论

肾小管间质病变与肾病预后关系密切, 及时发现并采取适当措施, 对延缓和阻止肾脏病变具有十分重要的临床意义^[2]。 β 2M 是早期诊断肾小管损害的灵敏指标; 肾小管轻微病变时, 尿蛋白定性试验阴性、血肌酐正常, 但 β 2M 水平已异常升高^[5-7]。血液中 β 2M 经肾小球自由滤过后在肾小管几乎全部被重吸收, 局部分解代谢; 正常情况下其在血中浓度很低且相对稳定, 尿排泄量少^[3]。不同原因引起的慢性肾功能不全患者血、尿 β 2M 浓度均升高。本研究发现, 血、24 h 尿 β 2M、尿 β 2M/TP 水平均与肾小管间质病变存在正相关, 血 β 2M 与肾小管间质病变的相关性最强, 证实血、尿 β 2M 是反映肾小管损伤的有效指标。但并非所有出现形态学改变的患者均出现 β 2M 的异常增加, 有 87.4% 的血 β 2M 正常患者出现不同程度的肾小管间质损伤, 其中 10.4% 出现中、重度肾小管间质病变。血 β 2M 水平小于临界值时, 其与肾小管间质病变的相关性消失, 可能与其自身生物学特点或疾病性质有关^[8], 也可能与肾小管有强大代偿能力, 重吸收 β 2M 的功能可在一定时期内维持于所谓正常水平有关。在临床工作中, 即使肾小管功能指标完全正常, 也需高度警惕可能已出现肾小管间质病变。联合检测多项肾小管功能指标, 如 α 1 微球蛋白^[6,9-10]、尿 N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶、尿渗透压、尿酸化功能等, 可提高早期肾小管间质病变检出率^[11-13]。必要时需及早进行肾活检, 直接观察形态学病理改变, 正确指导治疗和判断预后。

作为肾小管功能损伤标志物, 血、尿 β 2M 与肾小管间质形态学改变既联系密切, 又不完全平行。 β 2M 在异常范围时, 对

肾小管间质病变的辅助诊断价值较大。肾小球病变合并肾小管间质损伤时, 血、尿 β 2M 既受肾小管间质形态学改变影响, 也受肾小球病变影响。因此需综合分析患者具体诊断和临床表现, 正确评价 β 2M 对肾小管间质病变的诊断和预后作用。

参考文献

- [1] Meyer TW. Tubular injury in glomerular disease[J]. *Kidney Int*, 2003, 63(2): 774-787.
- [2] Nangaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(1): 17-25.
- [3] 李坤. 血、尿 β 2-微球蛋白在评价 2 型糖尿病患者肾脏早期损伤的应用价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(9): 854-855.
- [4] Katafuchi R, Kiyoshi Y, Oh Y, et al. Glomerular score as a prognosticator in IgA nephropathy: its usefulness and limitation[J]. *Clin Nephrol*, 1998, 49(1): 1-8.
- [5] 丁涤非, 丁体龙, 胡凯, 等. β 2-微球蛋白检测对顺铂肾毒性的早期诊断价值[J]. *中国基层医药*, 2010, 17(3): 321-322.
- [6] 马勇, 许吉斌. 血清 Cys-C、 β 2M、RBP 在 2 型糖尿病肾病早期诊断中的价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(2): 135-136.
- [7] 林一民, 林丁, 吴立翔. 血清 β 2-微球蛋白对肾功能的预测价值[J]. *重庆医学*, 2009, 38(20): 2557-2561.
- [8] 王健英, 赵军, 李新东, 等. 肾脏病患者血、尿 β 2-微球蛋白浓度与肾脏病理变化的关系研究[J]. *中国临床实用医学*, 2009, 3(5): 18-19.
- [9] 李强, 吴杰红, 孙守勋, 等. 联合检测尿 β 2M、NAG 及 AAP 在地震挤压伤肾损害中的意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, 31(4): 380-381.
- [10] 刘艳芳. 血和尿 β 2-微球蛋白、尿素氮、肌酐、尿蛋白联合检测在肾脏疾病诊断中的临床价值[J]. *临床合理用药杂志*, 2010, 3(21): 55.
- [11] Guder WG, Hofmann W. Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implications[J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2008, 68(241): 95-98.
- [12] 邵天波, 郭翀, 杨兰辉, 等. 24 h 尿蛋白和尿 NAG 与尿蛋白/肌酐比值及尿 NAG/肌酐比值的相关性研究[J]. *检验医学*, 2010, 25(5): 385-386.
- [13] 李惊子, 陈育青, 王素霞, 等. 常规尿检整合分类作为肾病理损伤的标志物[J]. *北京大学学报: 医学版*, 2010, 2(42): 169-172.

(收稿日期: 2010-05-04)

(上接第 151 页)

- 临床应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(6): 505-506.
- [9] 杨小猛, 赵丹, 苏卓娃. CD30 在强直性脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群的表达及意义[J]. *重庆医学*, 2010, 39(20): 2763-2765.
 - [10] Machura E, Mazur B, Rusek-Zychma M, et al. Cytokine production by peripheral blood CD4 and CD8 T cells in atopic childhood asthma [J/OL]. <http://www.hcbi.nlm.nih.gov/PMC/articles/PMC3004408/>.
 - [11] Richard D, Wigle Y. Rheumatic diseases in China[J]. *J Rheumatol*, 1994, 21(8): 1484-1490.

- [12] 黄烽, 杨春花. 强直性脊柱炎临床及免疫发病机制的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2001, 17(6): 281-284.
- [13] 谢其冰, 尹耕. 三种自身抗体在类风湿关节炎诊断及关节侵蚀预测中的价值[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2009, 40(3): 508-512.
- [14] Chen HA, Lin KC, Chen CH, et al. The effect of etanercept on anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(1): 35-39.

(收稿日期: 2010-05-04)