

论著·临床研究

原发性干燥综合征患者外周血 Th17 细胞及 CXCL13 检测及其临床意义*

王柏山

(辽宁中医药大学附属医院检验科, 沈阳 110032)

摘要:目的 探讨原发性干燥综合征(pSS)患者外周血 Th17 细胞和趋化因子 CXCL13 检测的应用价值及其在疾病发生、发展中的作用机制。方法 选取该院 73 例临床确认原发性干燥综合征患者作为 pSS 组, 40 例健康体检者作为对照组。由专科医师对 pSS 患者进行干燥综合征疾病活动指数(ESSDAI)评分。采用流式细胞方法检测 Th17 细胞, 酶联免疫吸附实验法检测 CXCL13 水平, 免疫透射比浊法检测免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA)。结果 pSS 组患者外周血 Th17 细胞、CXCL13、IgG、IgM 及 IgA 水平高于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。pSS 组中, ESSDAI 评分结果与 Th17 细胞、CXCL13、IgG 呈正相关($r = 0.58, 0.66, 0.48$), 且外周血 Th17 细胞与 CXCL13 水平呈正相关, 差异有统计学意义($r = 0.45, P < 0.05$)。结论 原发性干燥综合征患者血液中 Th17 细胞、CXCL13 水平及 IgG 检测有助于疾病活动性的判断; Th17 细胞、趋化因子 CXCL13 在 pSS 的发生发展过程中发挥重要的作用。

关键词:原发性干燥综合征; 干燥综合征疾病活动指数; Th17 细胞; 趋化因子 CXCL13

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.14.012 **中图法分类号:**R593.2

文章编号:1673-4130(2018)14-1705-04

文献标识码:A

Expression and significance of th17 cell and chemokine cxcl13 in peripheral blood of patients with primary sjögren's syndrome*

WANG Baishan

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110032, China)

Abstract: Objective To explore the significance of Th17 cell and chemokine CXCL13 in peripheral blood of patients with primary Sjögren's Syndrome and investigate the role of Th17 cell and chemokine CXCL13 in the pathogenesis of pSS. **Methods** 73 primary Sjögren's Syndrome patients were enrolled as pSS groups and 40 healthy volunteers were selected as control groups. Disease Activity Index(ESSDAI) of primary Sjögren's Syndrome patients was evaluated by physicians. Th17 cell was detected by flow cytometry; chemokine CXCL13 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay; IgG, IgM and IgA levels were detected by immunological transmission turbidimetry. **Results** Significantly increased levels of Th17 cell, chemokine CXCL13 and IgG were found in pSS groups comparing with control groups, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The levels of IgM and IgA in pSS groups were higher than those in control groups, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In pSS groups, there were positive correlations between the scores of ESSDAI and Th17 cell, chemokine CXCL13 and IgG respectively ($r = 0.58, 0.66, 0.48; P < 0.05$). The levels of chemokine CXCL13 expression showed a positive correlation with Th17 cell in pSS group ($r = 0.45; P < 0.05$). **Conclusion** The detection of Th17 cell, chemokine CXCL13 and IgG were contributed to estimate disease activity in patients with primary Sjögren's Syndrome. Th17 cell, chemokine CXCL13 may play an important role in the pathogenesis of pSS.

Key words: primary Sjögren's Syndrome; EULAR Sjögren's Syndrome disease activity index; Th17 cell; chemokine CXCL13

原发性干燥综合征(pSS)是一种较为常见的慢性 自身免疫性疾病,以泪腺和唾液腺等外分泌腺体的淋

* 基金项目:辽宁省教育厅科学研究课题(L2015342)。

作者简介:王柏山,男,主任技师,主要从事自身免疫病的临床实验诊断研究。

本文引用格式:王柏山.原发性干燥综合征患者外周血 Th17 细胞及 CXCL13 检测及其临床意义[J].国际检验医学杂志,2018,39(14):

巴浸润为病理基础,以眼干和口干为主要临床表现。pSS 还可累及骨骼、肾脏、血液等多种组织器官,本病多见于中年以上女性^[1]。其确切的发病机制仍不完全明确,目前研究认为,在 T 淋巴细胞大量浸润下,B 淋巴细胞的功能紊乱,产生多克隆免疫球蛋白引起使唾液腺和泪腺等外分泌腺发生炎症和破坏性病变^[2]。CXCL13 又名 B 淋巴细胞趋化因子,与其受体 CXCR5 结合并发挥功能。在 pSS 发生发展过程中介导 B 淋巴细胞迁移、寻靶及诱导次级淋巴组织生发中心的形成^[3]。Th17 细胞是机体中一种近年新发现的 CD4⁺ 效应 T 细胞,SUDZIUS 等^[4]认为 T 细胞在外周血液分化不均衡是 pSS 发病的一个重要因素,Th17 细胞分泌的白细胞介素(IL)-17 是强力的促炎因子,可以作用于多种类型细胞并诱导产生细胞因子包括促炎细胞因子、趋化因子(CXCL1、CXCL8、CXCL10)、基质金属蛋白酶等的表达^[5],特别是在 pSS 的发病和病情进展中起到重要作用^[6]。pSS 患者外周血中 Th17 细胞和 CXCL13 的联系及它们在 pSS 疾病活动度判断中的应用价值,目前国内鲜有报道。本文通过观察 pSS 患者外周血中 Th17 细胞和 CXCL13 水平的变化及其与疾病活动度之间的关系,初步探讨 pSS 患者外周血 Th17 细胞和 CXCL13 检测的应用价值及作用机制,并为临床治疗 pSS 探寻新的治疗靶点提供依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自 2013 年 10 月至 2015 年 10 月期间于本院风湿科门诊或住院诊断的 pSS 患者 73 例,女 65 例,男 8 例,年龄 22~68 岁,平均(51.77±11.79)岁;病程最短 3 个月,最长 11 年,平均病程(6.24±2.49)年。诊断均符合 2012 年美国风湿病学会干燥综合征分类(诊断)标准^[7],均为初次诊断,未经过任何激素及免疫抑制剂治疗。对照组选自本院健康体检者 40 例,女 37 例,男 3 例;年龄 30~70 岁,平均(52.41±10.27)岁。

1.2 试剂与仪器 主要为 BD 公司的 FACSCalibur 流式细胞仪、日立 7600-020 全自动生化分析仪。鼠抗人单克隆抗体 CD4-FITC、CD3-APC、IL-17-PE 及同型对照购自美国 BD 公司,佛波酯(PMA)、离子霉素(ionomycin)均购自美国 SIGMA 公司。CXCL13 酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒购自 R&D 公司。免疫球蛋白(IgG、IgM、IgA)试剂及配套校准品等购自

DiaSys 公司。

1.3 方法

1.3.1 检测方法 所有受检者清晨空腹抽取 2 mL 肝素锂抗凝血 1 管和 4 mL 非抗凝血 1 管分离血清。取 100 μL 抗凝血加入 96 孔平板中,加入 RPMI1640 (含小牛血清 10%)培养液 100 μL 稀释混匀,加入刺激剂(佛波酯)及阻断剂(离子霉素)各 10 μL,置于 37 °C,5% CO₂ 培养箱培养 5 h,取 200 μL 加入流式试管,PBS 缓冲液洗涤后离心弃上清。向管中加入 CD4-FITC、CD3-APC 单克隆抗体 10 μL,室温下避光反应 30 min。加入固定剂 100 μL,室温下避光孵育 15min,再用 PBS 洗涤 1 次离心弃上清。向管中加入破膜剂 100 μL,室温下再次避光孵育 15 min,PBS 洗涤 1 次离心弃上清,加入 IL-17-PE-CY5 单克隆抗体 5 μL 充分混匀,室温下避光孵育 20 min。用 PBS 洗涤 2 次后,加入 PBS300 μL 混匀细胞,用 FACSCalibur 流式细胞仪检测,检测 CD3⁺ CD4⁺ IL-17⁺ 细胞,即 Th17 细胞。MULTISET 软件进行分析。IgG、IgM、IgA 采用的是免疫透射比浊法。CXCL13 检测采用酶联免疫吸附实验法,严格按照试剂说明书进行操作。

1.3.2 观察指标 干燥综合征疾病活动指数(ESSDAI)评分评价方式^[8];所有患者由专科医生通过询问受试者病史、体格检查、辅助检查资料等方式了解其全身症状(发热、体质量下降)以及多脏器功能损害等情况变化,对应 ESSDAI 评分的要求对上述各项观察点进行从 0~2 或 3 的客观评分再乘以其对应的权重值,最后将其各项得分相加来得出疾病活动度情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据资料经正态性检验,正态分布资料两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,相关性分析采用 Pearson 相关系数检验。非正态分布资料两组间比较采用 Mann-Whitney *U* 检验,相关分析采用 Spearman 相关系数检验。所有统计检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 Th17 细胞、CXCL13 及免疫球蛋白检测结果比较 pSS 组患者外周血 Th17 细胞、CXCL13 及 IgG 水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。pSS 组患者外周血 IgM、IgA 水平也高于对照组,且差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组 Th17 细胞、CXCL13 及免疫球蛋白检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Th17 细胞(%)	CXCL13(pg/mL)	IgG(g/L)	IgM(g/L)	IgA(g/L)
对照组	40	0.47±0.19	54.20±28.20	12.76±1.25	1.14±0.12	2.31±0.23
pSS 组	73	2.27±1.10 [#]	169.70±86.30 [#]	28.40±7.91 [#]	1.72±0.96 [*]	3.03±1.05 [*]

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

2.2 pSS 组 ESSDAI 评分与 Th17 细胞、CXCL13 及

免疫球蛋白检测结果相关性分析 Spearman 相关性

分析结果显示, ESSDAI 评分与 Th17 细胞、CXCL13、IgG 呈正相关($r=0.58, 0.66, 0.48, P<0.05$)。ESSDAI 评分与 IgM、IgA 检测结果无相关性($r=0.29, 0.15, P>0.05$)。

2.3 pSS 组和健康对照组 Th17 细胞、CXCL13 结果相关性分析 相关性分析结果显示, pSS 组患者外周血 Th17 细胞、CXCL13 水平呈正相关($r=0.452, P<0.05$), 健康对照组外周血 Th17 细胞、CXCL13 水平间无相关性($r=0.209, P>0.05$)。

3 讨论

pSS 是三大常见的自身免疫性疾病之一, 该病在我国的患病率为 0.29%~0.77%, 尤其多见于女性, 男女患病比例为 1:17^[9]。pSS 确切的病因和发病机制尚不明确, T 淋巴细胞的免疫失调及其介导的 B 淋巴细胞免疫异常在其中起着关键作用^[10]。Th17 细胞是一种能够在核转录因子 ROR- γ t 调控下特异地分泌 IL-17 的 CD4⁺T 细胞。Th17 细胞不仅能分泌 IL-17, 还能分泌 IL-21、IL-22 等重要的细胞因子, 其中 IL-17 能够加重炎症反应, 参与多种自身免疫疾病^[11]。本研究显示, pSS 患者外周血 Th17 细胞明显增高, 与王文军等^[12]报道一致。本研究中, pSS 组 CXCL13 水平显著高于对照组, 差异有统计学意义($P<0.01$), 与国外 KRAMER 等^[13]研究结果一致。同时本研究结果还证明了 pSS 患者外周血免疫球蛋白 IgG、IgM 及 IgA 水平高于健康对照组。

随着人们健康意识的提升和对 pSS 认识的增加, 典型的临床症状加之自身免疫检验技术[包括抗核抗体谱(ANA)、抗 SSA、抗 SSB 等]的普及, 临床诊断 pSS 已不再是难题。但如何针对不同程度的疾病使用适应的治疗药物及手段, 一直困扰着一线临床医生, 很多临床医师根据自己的经验来判断患者病情变化, 难以对 pSS 进行规范化分析及治疗。2009 年欧洲风湿病联盟(EULAR)组织 30 多名专家制定了 ESSDAI 评分标准。随后, SEROR 等^[14]和 CAMPAR 等^[15]通过临床实践验证了其在 pSS 病情活动评估的有效性。近年, 我国的临床医生也逐步开始将 ESSDAI 应用于临床评估 pSS 病情活动度。ESSDAI 的评估系统主要包括 12 个方面, 分别为全身症状、淋巴结、腺体、关节、皮肤、肺、肾脏、骨骼肌、周围神经系统、中枢神经系统、血液系统、血清学(主要为 IgG)变化。但该指数评估过程中需要专业、有经验的临床医师严格按照评估项目进行, 操作繁琐并且具有一定的人为因素影响。本试验以标准 ESSDAI 的评估为标准, 对所有 pSS 患者进行了规范化地评估。并且把 ESSDAI 的评估得分与 Th17 细胞、CXCL13 及免疫球蛋白检测结果进行了相关性检验, 结果显示, ESSDAI 得分与 Th17 细胞、CXCL13 及 IgG 具有明显正相关($r=0.58, 0.66, 0.48, P<0.05$), 这也从客观上再次证明临床医生常以 IgG 的检测结果粗略判定

pSS 病情活动度的有效性^[16]。同时笔者还发现, Th17 细胞、CXCL13 检测与 ESSDAI 得分相关系数更高, 提示患者外周血 Th17 细胞、CXCL13 检测可应用于临床对 pSS 病情活动度的判定。

笔者还对 pSS 组和健康对照组外周血 Th17 细胞、CXCL13 水平进行相关性分析, 结果显示, pSS 组患者外周血 Th17 细胞、CXCL13 水平呈正相关, 健康对照组外周血 Th17 细胞、CXCL13 水平间无相关性。推测可能的原因是: 在正常情况下, CXCL13 水平较低, 且受多种细胞因子及包括 Th17 细胞在内的多种淋巴细胞的调节, 所以 Th17 细胞、CXCL13 水平之间没有体现出相关性。而在 pSS 发生、发展过程中, 由于某种因子的刺激下, Th0 细胞向 Th17 细胞转化增多, Th17 细胞分泌 IL-17 及 IL-21 等多种细胞因子。IL-17 可以参与唾液腺、泪腺等靶器官的炎症反应而导致 pSS 出现相关的临床症状^[17]。IL-21 可促进 B 细胞增殖、抗体类别转换及抗体分泌细胞产生等方面发挥重要的作用^[18]。B 细胞增殖促进次级淋巴器官(包括脾、淋巴结等)中的树突状细胞和巨噬细胞产生更多的 CXCL13^[19], 而 CXCL13 又可作用于表面表达 CXCR5(即 CXCL13 受体)的 Th17 细胞进一步活化和分泌 IL-17 及 IL-21 等多种细胞因子, 如此正反馈循环可能促进了 pSS 病情的发展并持续促使患者眼干、口干等临床症状。pSS 患者体内 CXCL13 与 Th17 细胞的相互作用机制可能更加复杂, 有待进一步研究和证实。

4 结论

原发性干燥综合征患者血液中 Th17 细胞、CXCL13 水平及 IgG 检测有助于疾病活动性的判断, Th17 细胞、趋化因子 CXCL13 在 pSS 的发生、发展过程中发挥重要的作用。

参考文献

- [1] FICHE A, MENEZES A V, VALERIO C S, et al. Clinical, imaging, and laboratory findings in sjögren's syndrome[J]. Compend Contin Educ Dent, 2017, 38(8): 520-525.
- [2] TONG L, KOH V, THONG B Y. Review of autoantigens in Sjögren's syndrome: an update[J]. J Inflamm Res, 2017, 10(10): 97-105.
- [3] 金莉, 厉小梅. 趋化因子及其受体在干燥综合征中的作用[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2012, 6(2): 131-135.
- [4] SUDZIUS G, MELIAUSKAITE D, BUTRIMIENE I, et al. Activity of T-helper cells in patients with primary Sjögren's syndrome[J]. In Vivo, 2013, 27(2): 263-268.
- [5] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU LIANG, et al. The orphan nuclear receptor ROR gamma t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17(+) T helper cells[J]. Cell, 2006, 126(6): 1121-1133.
- [6] HALDORSEN K, BJELLAND I, BOLSTAD A I, et al. A five-year prospective study of fatigue (下转第 1711 页)

4 结 论

hs-cTnT、MYO 对肾功能不全患者不仅具有早期监测心血管事件的意义,而且可以作为肾功能的监测指标;不仅有利于患者病情进展的评估,更具有降低死亡率的重要意义。

参考文献

[1] 肖文凯,叶平. 慢性肾脏病患者血清高敏肌钙蛋白 T 水平变化及意义[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2015, 17(5): 546-548.

[2] 鄢盛恺. 高敏感心肌肌钙蛋白检测的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33: 809-813.

[3] APPLE F S, COLLINSON P O. Analytical characteristics of high-sensitivity cardiac troponin assays [J]. Clin Chem, 2012, 58: 54-61.

[4] Causes of death. United states renal data system[J]. Am J Kidney Dis. 1998, 32(2 Suppl 1): S81-88.

[5] LEVEY A S, STEVENS L A. Estimating GFR using the CKD epidemiology collaboration (CKD-EPI) creatinine equation; more accurate GFR estimates, lower CKD prevalence estimates, and better risk predictions[J]. Am J Kidney Dis, 2010, 55(4): 622-627.

[6] 刘蔓莉,王平,龚蓉. 慢性肾功能衰竭维持性血液透析患者血清肌钙蛋白 T 水平的变化及意义[J]. 实用临床医学, 2007, 8(7): 5-7.

[7] FOLEY R N, PARFREY P S, SARNAK M J. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal dis-

ease[J]. Am J Kidney Dis, 1998, 32(5): 112-119.

[8] CERASOLA G, NARDI E, MULE G, et al. Left ventricular mass in hypertensive patients with mild-to-moderate reduction of renal function[J]. Nephrology (Carlton), 2010, 15(2): 203-210.

[9] 干艳捷,章艳萍,何琼. 慢性肾功能衰竭患者心肌肌钙蛋白 T 水平的临床观察[J]. 山西医药杂志, 2011, 9(40): 923-924.

[10] 谭若芸,赵卫红. 慢性肾功能衰竭患者血清肌钙蛋白 T/TI 的变化及其临床意义[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2003, 23(5): 571-573.

[11] 于晓丽. 高敏肌钙蛋白 T 检测在心肌梗死中应用价值的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(1): 119-120.

[12] 李芬,朱现菊. 高敏心肌肌钙蛋白 T 水平与维持性血液透析患者心脏结构和功能的关系[J]. 中国血液净化, 2014, 13(5): 377-379.

[13] 周宏久,姚翠微,陶静莉. 慢性肾衰竭患者血清肌红蛋白、肌钙蛋白 I 校正公式的建立[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(3): 515-518.

[14] COLLINSON P O, BOA F C, GAZE D C. Measurement of cardiactroponins[J]. Clin Biochem, 2001, 38: 423.

[15] 李光富,向小节,郭小聪,等. 心脏标志物检测在肾功能不全患者中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16): 2149-2153.

(收稿日期:2018-01-22 修回日期:2018-03-28)

(上接第 1707 页)

in primary Sjögren's syndrome[J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(5): R167.

[7] SHIBOSKI S C, SHIBOSKI C H, CRISWELL L A, et al. American college of rheumatology classification criteria for sjögren's syndrome; a data-driven, expert consensus approach in the sjögren's international collaborative clinical alliance cohort[J]. Arthritis Care Res (Hoboken), 2012, 64(4): 475-487.

[8] SEROR R, BOWMAN S J, BRITO-ZERON P, et al. EULAR sjögren's syndrome disease activity index (ESS-DAD): a user guide[J]. RMD open, 2015, 1(1): e000022.

[9] ZHAO Y, LI Y, WANG L, et al. Primary sjögren syndrome in Han Chinese: clinical and immunological characteristics of 483 patients[J]. Medicine, 2015, 94(16): e667.

[10] STOCKINGER B, BOURGEOIS C, KASSIOTIS G. CD4⁺ memory T cells: functional differentiation and homeostasis[J]. Immunol Rev, 2006, 211(1): 39-48.

[11] 杨金娜,刘晓光,李覃,等. Th17/Treg 平衡在类风湿关节炎中作用的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1045-1048.

[12] 王文军,温江涛. 原发性干燥综合征患者外周血 Th17 细胞的检测及意义[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(6): 1039-1040.

[13] KRAMER J M, KLIMATCHEVA E, ROTHSTEIN T L. CXCL13 is elevated in Sjögren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis[J]. J Leukoc Biol, 2013, 94(5): 1079-1089.

[14] SEROR R, THEANDER E, BRUN J G, et al. Validation of EULAR primary Sjögren's syndrome disease activity (ESSDAI) and patient indexes (ESSPRI) [J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(5): 859-866.

[15] CAMPAR A, ISENBERG D A. Primary sjögren's syndrome activity and damage indices comparison[J]. Eur J Clin Invest, 2010, 40(7): 636-644.

[16] 吴春玲,刘海娜,杨娉婷,等. 干燥综合征患者外周血 T 细胞 CCR7 的表达与疾病活动性的关系[J]. 免疫学杂志, 2010, 26(11): 953-961.

[17] 魏斐斐,杨麟,王永福. Th17 细胞及 IL-17 与干燥综合征的研究进展[J]. 包头医学院学报, 2013, 29(6): 136-139.

[18] KUCHEN S, ROBBINS R, SIMS G P, et al. Essential role of IL-21 in B cell activation, expansion, and plasma cell Generation during CD4⁺ T cell-B cell collaboration[J]. J Immunol, 2007, 179(9): 5886-5896.

[19] 李留霞,达展云. 趋化因子 CXCL13 与系统性红斑狼疮的关系研究[J]. 南通大学学报(医学版), 2016, 36(4): 287-290.

(收稿日期:2017-12-24 修回日期:2018-03-11)