

· 临床研究 ·

CD30 在强直性脊柱炎患者外周血 T 细胞亚群的表达及意义*

杨小猛¹, 赵丹², 苏卓娃³

(1. 深圳市罗湖区妇幼保健院检验科 518019; 2. 深圳市罗湖区慢性病防治院检验科 518109; 3. 深圳市南山人民医院中心实验室 518024)

摘要:目的 研究 CD30 在强直性脊柱炎(AS)患者外周血 T 细胞亚群的表达及意义,分析 AS 患者免疫学发病机制。方法 健康对照组 24 例,患者组 CT 检查 AS 患者骶髂关节并分为 I (11 例)、II (12 例)和 III 级(10 例)。采用 ECD 标记抗 CD3 单抗, PE-Cy5 标记抗 CD4、CD8 单抗以及 FITC 标记抗 CD30 单抗作三色流式细胞术; CD3/CD4、CD3/CD8 设门,分析 CD30 在 AS 患者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞的表达水平。结果 健康对照比较,CD4⁺CD30⁻T 细胞在 I、II 级 AS 患者中均明显降低($P < 0.05$),在 III 级 AS 患者中则明显升高($P < 0.05$);CD8⁺CD30⁻T 细胞在 II 级 AS 患者明显升高($P < 0.05$);CD8⁺CD30⁺T 细胞在 AS 各级患者中均明显升高($P < 0.05$)。结论 AS 各级患者外周血 T 细胞亚群比例失衡与患者外周免疫功能紊乱及疾病进程有关。

关键词: 脊柱炎;强直性;CD30; T 细胞亚群

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.20.028

中图分类号:R593.23

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)20-2763-03

Determination of CD30 on peripheral blood T cell subsets in ankylosing spondylitis patients*

YANG Xiao-meng¹, ZHAO Dan², SU Zhuo-wa³

(1. Department of Laboratory, Luohu Women and Children's Hospital, Shenzhen 518019, China;

2. Department of Laboratory, Luohu Chronic Disease Prevention and Cure Hospital, Shenzhen 518109, China;

3. Central Laboratory, Nanshan People's Hospital, Shenzhen 518024, China)

Abstract: Objective To determine the CD30 expression on peripheral blood T lymphocyte subsets in patients with ankylosing spondylitis (AS). **Methods** The ankylosing spondylitis patients were diagnosed in accordance with 1984' diagnostic criteria of ankylosing spondylitis and divided into grade I (11 cases), II (12 cases) and III (10 cases) as computerized tomography (CT). The percentages of CD4⁺CD30⁻T, CD4⁺CD30⁺T, CD8⁺CD30⁻T, CD8⁺CD30⁺T in peripheral blood of AS patients and healthy control (24 cases) were analyzed by immunofluorescence staining and three-color flow cytometry (FCM) using CD3/CD4, CD3/CD8 gating in vitro. **Results** The percentages of CD4⁺CD30⁻T in AS grade I and II were clearly lower than healthy control ($P < 0.05$) while those in AS grade III were obviously higher than healthy control ($P < 0.05$). Meanwhile the percentages of CD4⁺T, CD8⁺T and the ratios of CD4⁺T/CD8⁺T in AS grade III changed little as compared with healthy control ($P > 0.05$). The percentages of CD8⁺CD30⁻T in grade II and the percentages of CD8⁺CD30⁺T in all of AS patients were more higher than healthy control ($P < 0.05$). **Conclusion** It is suggested that the cellular immunity and humoral immunity may be disorder in AS patients. The loss of balance between T lymphocyte subsets may play an important role in the immunopathogenesis of AS and be correlated to the proceeding of patient's condition closely.

Key words: spondylitis; ankylosing; CD30; 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,其发病机制尚未完全明确。研究发现, T 细胞亚群比例紊乱在多种自身免疫性疾病中起重要的作用^[1-3]。CD30 是一种 T 细胞亚群表面标志物,主要表达在 Th2、Tc2 类细胞上,并且与此类细胞的激活有关^[4]。因此,本研究拟检测 CD30 在 AS 患者 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞上表达状况,并进一步探讨 AS 患者免疫功能状态。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2001 年 7 月至 2005 年 6 月,深圳市南山人民医院门诊及住院的已作双侧骶髂关节 CT 扫描的 AS 患者共 33 例为患者组,男 23 例,女 10 例,中位年龄 28 岁(18

~47 岁)。AS 患者符合 1984 年纽约修订的 AS 诊断标准,并按 CT 结果分为 I、II 和 III 级^[5],诊断前未应用柳氮磺胺嘧啶、甲氨蝶呤正规治疗。按年龄配对,设健康对照组男 15 例,女 9 例,中位年龄 30 岁(18~45 岁)。

1.2 主要试剂与仪器 ECD 标记抗 CD3 单抗及同型对照为 Immunotech 公司产品、FITC 标记 CD30 及同型对照为 BD 公司产品、PE-Cy5 标记抗 CD4、CD8 单抗及同型对照为 BD 公司产品、EPICS-XL 型流式细胞仪为 Beckman Coulter 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 荧光染色 取 AS 患者及健康对照者静脉血 3 mL,肝素钠抗凝。取 3 支试管,各管加入 100 μL 全血,管 1(同型对照

* 基金项目:深圳市科技局科技计划基金资助项目(200405067)。

管)加入小鼠抗人单克隆 IgG1-ECD、IgG1-PE-Cy5 和 IgG1-FITC;管 2(CD4 管)加入抗 CD4-PE-Cy5、抗 CD3-ECD 和抗 CD30-FITC;管 3(CD8 管)加入抗 CD8-PE-Cy5、抗 CD3-ECD 和抗 CD30-FITC。各种标记抗体均为 10 μ L,混匀,室温避光孵育 20 min。加入 Optilyse C(contains 1.5% formaldehyde) 500 μ L,室温避光孵育 10 min。加 PBS 500 μ L,室温避光孵育 10 min,每分钟 1 500 r 离心 5 min,弃上清液,各管加入 0.75 mL PBS,待测。

1.3.2 流式细胞仪检测 用标准荧光微球(Flowcheck)调整流式细胞仪,使各通道变异系数稳定在 2%以内,以 CD3/CD4、CD3/CD8 设门,每份标本检测 10 000 个 CD3⁺T 细胞,记录结果。

1.4 统计学方法 检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,患者与健康对照者结果比较采用成组设计的 t 检验,采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AS 患者及健康对照者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞百分率 与健康对照组比较, I 和 II 级 AS 患者外周血 CD4⁺T 细胞明显降低($P < 0.01$), CD8⁺T 细胞明显升高($P < 0.01$), CD4⁺T/CD8⁺T 比值明显降低, III 级 AS 患者 CD4⁺T、CD8⁺T 均无明显变化($P > 0.05$);与 I 级 AS 患者组比较, II 级 AS 患者外周血 CD8⁺T 细胞明显升高($P < 0.01$), CD4⁺T/CD8⁺T 比值明显降低(表 1)。

表 1 AS 患者及健康对照 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞表达情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD4 ⁺ T	CD8 ⁺ T	CD4 ⁺ T/CD8 ⁺ T
健康对照组	24	39.96 \pm 6.52	23.61 \pm 4.31	1.55 \pm 0.27
I 级 AS 患者组	11	32.51 \pm 6.76*	28.45 \pm 5.72*	1.14 \pm 0.07*
II 级 AS 患者组	12	31.26 \pm 5.94*	38.30 \pm 1.44*#	0.82 \pm 0.16*#
III 级 AS 患者组	10	40.01 \pm 6.68	20.90 \pm 0.81	1.72 \pm 0.16

与健康对照组比较,* : $P < 0.01$;与 I 级 AS 患者组比较,# : $P < 0.01$ 。

表 2 CD30 在 AS 患者及健康对照 CD4⁺T 细胞上表达情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD30 ⁻	CD30 ⁺	CD30 ⁻ /CD30 ⁺
健康对照组	24	52.83 \pm 4.85	1.68 \pm 0.39	33.01 \pm 7.52
I 级 AS 患者组	11	48.94 \pm 4.45*	1.55 \pm 0.22*	29.48 \pm 3.18
II 级 AS 患者组	12	42.14 \pm 4.89* Δ	1.63 \pm 0.39 Δ	27.19 \pm 6.70*
III 级 AS 患者组	10	57.12 \pm 4.91* Δ	1.91 \pm 0.42* Δ	31.48 \pm 10.48

与健康对照组比较,* : $P < 0.05$,# : $P < 0.01$;与 I 级 AS 患者组比较, Δ : $P < 0.01$ 。

2.2 CD30 在 AS 患者及健康对照者外周血 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞上表达百分率 与健康对照组比较, I 和 II 级 AS 患者外周血 CD4⁺CD30⁻T 细胞明显降低($P < 0.05$),而 III 级 AS 患者 CD4⁺CD30⁻T 细胞则明显升高($P < 0.05$); I 和 II 级 AS 患者 CD8⁺CD30⁻T 细胞均升高,仅 II 级 AS 患者差异有统计学意义($P < 0.05$); I 级 AS 患者 CD4⁺CD30⁺T 细胞明显降低($P < 0.05$), III 级 AS 患者 CD4⁺CD30⁺T 细胞明显升高($P < 0.01$),各级 AS 患者 CD8⁺CD30⁺T 细胞均明显升高($P <$

0.05); II 级 AS 患者 CD4⁺CD30⁻/CD4⁺CD30⁺ 比值明显降低($P < 0.05$),各级 AS 患者 CD8⁺CD30⁻/CD8⁺CD30⁺ 比值均明显降低($P < 0.01$)。与 I 级 AS 患者比较, II、III 级 AS 患者 CD4⁺CD30⁺T 细胞明显升高($P < 0.01$); II 级 AS 患者 CD8⁺CD30⁺T 细胞明显升高($P < 0.01$),而 III 级 AS 患者 CD8⁺CD30⁺T 细胞明显降低($P < 0.01$); II、III 级 AS 患者 CD8⁺CD30⁻/CD8⁺CD30⁺ 比均明显升高($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),见表 2、3。

表 3 CD30 在 AS 患者及健康对照 CD8⁺T 细胞上表达情况(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	CD30 ⁻	CD30 ⁺	CD30 ⁻ /CD30 ⁺
健康对照组	24	31.66 \pm 6.47	2.69 \pm 0.28	11.82 \pm 2.45
I 级 AS 患者组	11	33.25 \pm 3.57	4.29 \pm 0.48*	7.75 \pm 0.15*
II 级 AS 患者组	12	43.19 \pm 5.25* Δ	4.67 \pm 0.71* Δ	9.34 \pm 1.11* Δ
III 级 AS 患者组	10	30.44 \pm 4.54	3.32 \pm 0.91* Δ	9.63 \pm 3.11* Δ

与健康对照组比较,* : $P < 0.05$,# : $P < 0.01$;与 I 级 AS 患者组比较, Δ : $P < 0.05$,* : $P < 0.01$ 。

3 讨 论

T 细胞亚群间相互协作和(或)制约,能产生适度的免疫应答,既能清除病原体,又能避免过强的免疫反应损伤自身组织,这种动态平衡和网络调节是机体发挥正常免疫自稳功能的重要因素;动态平衡的失调将可能诱发免疫缺陷、超敏反应以及自身免疫等多种异常免疫现象^[6-7]。探讨 T 细胞亚群间平衡状态对研究 AS 等自身免疫性疾病的免疫发病机制、疾病的进展具有重要的理论和实践意义。

研究表明 CD4⁺T/CD8⁺T 细胞动态平衡在自身免疫疾病的发生、发展过程中起重要作用^[8-9]。CD4 是 T 辅助/诱导细胞(Th/Ti)的表面标志,CD4⁺T 细胞具有辅助 T 细胞转化成效应细胞、B 细胞转化成浆细胞、活化巨噬细胞等功能起辅助、诱导细胞及体液免疫的作用。而 CD8 是 T 抑制/杀伤细胞(Ts/Tc)的表面标志,CD8⁺T 细胞具有细胞毒效应及抑制 T 细胞活化、抑制 B 细胞产生,起抑制细胞及体液免疫的作用。CD4⁺T/CD8⁺T 比值变化反应了机体的免疫功能状况,比值升高提示免疫功能亢进,比值降低提示免疫功能低下。本研究检测了 AS 患者外周血 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞,发现在不同严重程度疾病中,患者外周血免疫功能变化存在差异, I、II 级 AS 患者 CD4⁺T 细胞百分率和 CD4⁺T/CD8⁺T 比值均明显低于健康对照者,CD8⁺T 细胞百分率明显高于健康对照者,并且随病情加重这种免疫学变化更为显著。研究结果提示 I、II 级 AS 患者外周血免疫功能低下,并且低下程度与疾病严重程度有关。本研究还发现, III 级 AS 患者外周血免疫功能无明显变化,这可能与患者炎症部位纤维化、骨化以及机体对局部炎症的免疫反应减弱有关。

CD4⁺T 细胞根据其功能和细胞因子分泌谱不同可分为 Th1 和 Th2 细胞。Th1 细胞主要分泌 IL-2、TNF- β 、IFN- γ 等细胞因子,参与细胞内微生物感染以及迟发型变态反应等细胞免疫反应。Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-10 等细胞因子,可促进 IgE 等抗体的产生,活化嗜酸性粒细胞,并抑制巨噬细胞的功能;Th2 细胞主要在蠕虫感染以及一些变态反应中发挥促进体液免疫的作用。同样,CD8⁺T 细胞分为分泌 Th1 类细胞因

子的 Tc1 细胞和 Th2 类细胞因子的 Tc2 细胞。目前将 Th1 和 Tc1、Th2 和 Tc2 分别统称为 Th1 类和 Th2 类细胞。Th1 类细胞优势介导细胞免疫, Th2 类细胞优势介导体液免疫, Th1/Th2 细胞间动态平衡是体内体液免疫及细胞免疫间重要的调节枢纽^[10]。有研究发现 AS 患者外周血淋巴细胞以 Th1 类细胞为主,但也有研究发现 AS 患者体内存在着 Th1/Th2 动态平衡偏移,即 Th1 类细胞激活程度低下,而 Th2 类细胞激活程度增强。

出现以上 2 种不同结果的原因目前尚不清楚,因此,本研究拟探讨各级 AS 患者外周血 Th1/Th2 平衡状况,以期阐明 AS 患者的免疫学发病机制。近年来国内外学者广泛研究证实,肿瘤坏死因子/神经生长因子受体家族成员 CD30 可持续高表达于激活的 CD4⁺ Th2 细胞,而 Th1 则完全不表达或仅极微量表达^[11]。另外,激活的 CD8⁺ Tc2 细胞也能表达 CD30 分子,并且 Tc1 细胞也完全不表达或极微量表达 CD30 分子。可见 T 细胞膜上 CD30 分子表达可作为鉴别 Th1/Th2、Tc1/Tc2 细胞的一种较特异的表面标志物。CD30 分子不仅仅是一种表面标志物,还作为一种共刺激分子通过与表达在 B 淋巴细胞和活化的巨噬细胞、T 细胞上的天然配体 CD30L 的交联促进 Th2 类细胞的活化、增殖和效应功能^[12]。因此,检测 CD30 在 AS 各级患者 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞上的表达可分析疾病 T 细胞亚群平衡偏移和异常激活情况,并能进一步探讨其发病机制。本研究发现 CD4⁺ CD30⁻ T 细胞(Th1 细胞)在 I、II 级 AS 患者中明显降低,而在 III 级 AS 患者中明显升高,CD4⁺ CD30⁺ T 细胞(Th2 细胞)则在 AS 各级患者中均无明显变化。结果表明 I、II 级 AS 患者细胞免疫功能可能受到抑制,体液免疫则相对亢进,而 III 级 AS 患者细胞免疫功能增强,体液免疫则相对受到抑制。本研究还发现 CD8⁺ CD30⁻ T 细胞(Tc1 细胞)在 II 级 AS 患者中明显升高,在各级 AS 患者中 CD8⁺ CD30⁺ T 细胞(Tc2 细胞)均明显升高。Tc1 细胞即通常所说的细胞毒 T 细胞(Tc),激活的 Tc1 细胞是机体内重要的杀伤细胞,可分泌穿孔素和颗粒酶,杀伤靶细胞。II 级 AS 患者 CD8⁺ CD30⁻ T 细胞明显升高提示 II 级 AS 患者体内存在过强的细胞毒性作用,在杀伤有害成分的同时,也引起自身组织和器官的严重损伤和病理改变,从而加快疾病进程,造成关节不可逆转的骨化强直。另外,虽然各级 AS 患者 CD8⁺ CD30⁺ T 细胞均明显升高,但 CD8⁺ CD30⁻ T/CD8⁺ CD30⁺ T 比值明显降低仍提示各级 AS 患者体内自身反应性体液免疫功能亢进。因此,II 级 AS 患者既存在细胞免疫,又存在体液免疫,但以体液免疫为主。同时本研究发现 CD30 在 CD8⁺ T 细胞上的表达高于在 CD4⁺ T 细胞上的表达,这可能与观察患者主要为 HLA-B27 阳性病例(78%)有关,因为 HLA-B27 属 MHC I 类分子,主要提呈内源性抗原给 CD8⁺ T 细胞,诱导 CD8⁺ T 细胞的激活。

参与文献:

- [1] Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, et al. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes [J]. *J Immunol*, 2009, 183(11): 7169.
- [2] Jacobo P, Guazzone VA, Jarazo-Dietrich S, et al. Differential changes in CD4⁺ and CD8⁺ effector and regulatory T lymphocyte subsets in the testis of rats undergoing autoimmune orchitis [J]. *J Reprod Immunol*, 2009, 81(1): 44.
- [3] 杨健. T 细胞分化及其细胞因子在特异性皮炎发病机制中的意义 [J]. *广东医学*, 2003, 24(9): 912.
- [4] 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.
- [5] 冯英凯, 徐剑铖, 杨庆华, 等. 内毒素肺损伤大鼠 Th1/Th2 细胞漂移的变化及其作用探讨 [J]. *重庆医学*, 2004, 33(10): 1210.
- [6] 韦爱菊, 刘振翔. 紫癜性肾炎患儿免疫功能的测定及意义探讨 [J]. *广西医学*, 2005, 27(10): 1067.
- [7] 冯大鸣, 田长斌, 杨小猛, 等. 类风湿关节炎患者外周血 T 细胞亚群极化状态的分析 [J]. *中华临床医学杂志*, 2006, 7(1): 27.
- [8] 刘仿, 杨小猛, 陈群, 等. CRTh2 在特发性血小板减少性紫癜 T 细胞亚群表达的检测 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2004, 24(9): 755.
- [9] 马莉, 杨洁, 李虹. 强直性脊柱炎 TH 亚群激活及 T 细胞活化状态研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2004, 20(8): 572.
- [10] Van Roon AG, Bijlsma WJ. Th2 mediated regulation in RA and the spondyloarthropathies [J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2002, 61: 951.
- [11] Watanabe M, Yamamoto N, Maruoka H, et al. Relation of CD30 molecules on T cell subsets to the severity of autoimmune thyroid disease [J]. *Thyroid*, 2003, 13(3): 259.
- [12] Pellegrini P, Totaro R, Contasta I, et al. CD30 antigen and multiple sclerosis: CD30, an important costimulatory molecule and marker of a regulatory subpopulation of dendritic cells, is involved in the maintenance of the physiological balance between Th1/Th2 immune responses and tolerance. The role of IFNβ-1a in the treatment of multiple sclerosis [J]. *Neuro Immuno Modulation*, 2005, 12(4): 220.

(收稿日期: 2010-02-12 修回日期: 2010-03-04)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!