

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.32.012

# 白芍总苷辅助治疗 SLE 对患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达的影响\*

钟益萍,米向斌,张堂德,孙乐栋<sup>△</sup>

(南方医科大学珠江医院皮肤科,广州 510282)

**摘要:**目的 探讨白芍总苷(TGP)辅助治疗系统性红斑狼疮(SLE)对患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达水平的影响。方法 采用流式细胞术检测健康对照组、常规组、TGP 组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞比率。结果 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率为(6.15±1.21)%,健康对照组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率为(12.30±1.78)%。活动期 SLE 患者与健康对照组 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率比较,差异有统计学意义( $t=22.03, P<0.05$ );常规组治疗前后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平差异有统计学意义( $t=-12.30, P<0.05$ );TGP 组治疗前后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平差异也有统计学意义( $t=-16.68, P<0.05$ )。常规组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平为(9.34±1.37)%,TGP 组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平为(11.49±1.14)%,两组差异有统计学意义( $t=-6.46, P<0.05$ )。结论 活动期 SLE 患者 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率水平显著低于健康对照组;SLE 患者经过 TGP 辅助治疗后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率显著提高。TGP 治疗可能作用于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞。

**关键词:**红斑狼疮,系统性;流式细胞术;CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞;白芍总苷

**中图分类号:**R751

**文献标识码:**A

**文章编号:**1671-8348(2014)32-4311-03

## The effect of TGP assisted treatment of SLE on the expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T in patient peripheral blood\*

Zhong Yiping, Mi Xiangbin, Zhang Tangde, Sun Ledong<sup>△</sup>

(Department of Dermatology, the Affiliated Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510282, China)

**Abstract:** **Objective** to investigate the effect of TGP assisted treatment of SLE on the expression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T in patient peripheral blood. **Methods** flow cytometry was used to detect the peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in healthy group, routine group and TGP group. **Results** The expression rate of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in SLE patients was (6.15±1.21)%, and that of the healthy controls was (12.30±1.78)%. The expression rate of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in active SLE patients and healthy controls were significantly different ( $t=22.03, P<0.05$ ). In the routine group, the expression rate of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells before and after treatment were significantly different ( $t=12.30, P<0.05$ ); in the TGP group, the expression rate of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells before and after treatment were significantly different, too ( $t=16.68, P<0.05$ ). The expression rate of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in routine group and TGP group were (9.34±1.37)% and (11.49±1.14)% respectively, and the difference was statistically significant ( $t=6.46, P<0.05$ ). **Conclusion** The expression rate of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in active SLE patients was significantly lower than that of healthy controls; the expression rate of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells in SLE patients increased significantly after treatment. The TGP treatment may work on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells.

**Key words:** lupus erythematosus, systemic; flow cytometry; CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells; TGP

目前,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞在系统性红斑狼疮(SLE)中的发病机制越来越受关注,且发现 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞在疾病发展中数量降低及功能下降<sup>[1-2]</sup>。有研究表明,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞在机体中能控制自身免疫反应和维持免疫耐受;且 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞控制机体损伤后的免疫反应,即如果机体内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞缺失可能将导致 SLE 发生<sup>[3]</sup>。临床治疗 SLE 中,在使用糖皮质激素和免疫抑制剂的基础上加用白芍总苷(TGP)可显著减少激素的用量及降低不良反应<sup>[4-9]</sup>。然而,TGP 治疗 SLE 的详细机制目前仍不清。因此,对 TGP 辅助治疗 SLE 的研究有重要意义。

目前,关于 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞在 SLE 患者中的研究较

多,但关于 TGP 对 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞比率变化的影响研究则报道相对较少。因此,本研究探讨 TGP 治疗 SLE 时对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的调控作用,探讨 TGP 治疗 SLE 的免疫学机制,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2012 年 3 月至 2013 年 9 月本院皮肤科就诊的活动期 SLE 患者 60 例,其中男 4 例,女 56 例,年龄 18~49 岁,平均 32 岁。分为常规组(30 例),TGP 组(30 例)。诊断标准严格按照美国风湿病学院 1997 年修订的 SLE 分类标准执行。按 SLE 病情活动程度的评价根据美国 SLE 疾病活动指数评分(SLEDAI)选取活动期患者(≥6 分)。同时选取 60

\* 基金项目:国家自然科学基金青年资助项目(81201233)。 作者简介:钟益萍(1987-),硕士,主要从事系统性红斑狼疮,激光美容。 △

通讯作者, Tel:13829754145; E-mail:sunledong126@126.com。

例本院健康体检者为对照组。全部患者均无哮喘、荨麻疹、湿疹、糖尿病、炎症性肠病和其他风湿病<sup>[10]</sup>。2 组间性别、年龄比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),具有可比性。

**1.2 仪器与试剂** 藻红蛋白(PE)标记的鼠抗人 CD25<sup>+</sup> 单克隆抗体(IgG2a/PE)、异硫氰荧光素(FITC)标记的鼠抗人 CD4<sup>+</sup> 单克隆抗体(IgG2b/FITC)、同型对照鼠 IgG2b/FITC、鼠 IgG2a/PE(深圳晶美有限公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司仪器)<sup>[11]</sup>。

### 1.3 方法

**1.3.1 病例采集** 晨起空腹抗凝管抽取静脉血 2 mL,离心取血清标本,抗凝血 100  $\mu$ L,室温放置 30 min 后立即送检。

**1.3.2 治疗方法** 两组患者均用泼尼松联合环磷酰胺治疗,剂量和方法参考 2010 版中华医学会风湿病分会系统性红斑狼疮诊断及治疗指南。泼尼松的用量为 0.5~1.0 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  d<sup>-1</sup>,治疗 6 周后,周用量每周减少 5 mg,至 30 mg/d。如治疗过程中出现病情复发或加重情况,恢复糖皮质激素使用剂量至 0.5~1.0 mg/kg。环磷酰胺(CYC)冲击疗法:CYC 0.50~0.75 g/m<sup>2</sup> 体表面积+生理盐水 100 mL,1 h 内快速静脉滴注。如治疗过程中出现复发或病情加重等情况,则缩短 CYC 冲击时间。TGP 组患者在此基础上加用 TGP 治疗(剂量为 0.6 g,2 次/d),疗程 60 d。所有患者于第 1、60 天抽取晨起空腹外周静脉血。

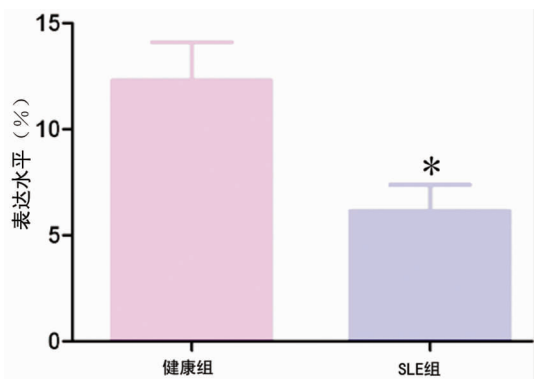
**1.3.3 临床观察指标** 患者临床表现(发热、新发皮疹、口腔溃疡、关节炎、脱发、中枢神经系统损害)、实验室检查(血常规、尿常规、大便常规,补体、抗双链 DNA 抗体、抗核抗体、抗 Sm 抗体、心脏彩超、腹部彩超、肺部 CT)<sup>[10]</sup>。

**1.3.4 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞百分率的检测** 标本分两管流式管:检测管和同型对照管。取乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝的 SLE 患者外周血 100  $\mu$ L,分别放入各流式管内。检测管加入 IgG2b 及 IgG2a,同型对照管加入鼠 IgG2b/FITC 及鼠 IgG2a/PE 各 10  $\mu$ L,轻轻混匀。室温避光 20 min 后,加入红细胞裂解液 2 mL,振荡混匀后避光至 10 min。1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入磷酸盐缓冲液(PBS)悬浮细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,再用 PBS 冲洗 1 次,离心弃上清液,加入 0.3 mL PBS 悬浮细胞,室温避光 10 min 后上机使用光源 488 nm 的氩激光,上机前先用标准微球进行光路和流路的校正,使变异系数(CV)在 2% 以下。用同型对照确定荧光阴性范围,根据细胞的前向角散射光(FSC)和侧向角散射光(SSC)特性初步圈取淋巴细胞群门,每份标本中测定淋巴细胞群门中 10 000 个淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的百分率,实验步骤参照文献<sup>[11]</sup>。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用配对  $t$  检测或独立  $t$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

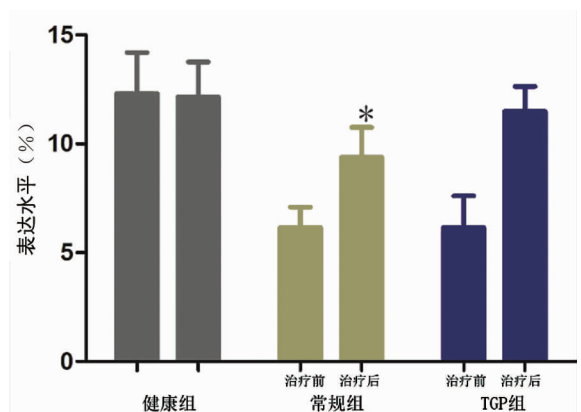
**2.1 SLE 患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平** SLE 患者治疗前和健康对照组外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平为(6.15 $\pm$ 1.21)%和(12.30 $\pm$ 1.78)%。其中 SLE 患者治疗前外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平低于健康对照组,差异有统计学意义( $t=22.03, P<0.05$ ),见图 1。



\*:  $P<0.05$ ,与健康组比较。

图 1 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平的比较

**2.2 SLE 患者经 2 种方案治疗后外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平** 常规组治疗前后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率为(6.15 $\pm$ 0.94)%、(9.38 $\pm$ 1.37)% ,二者差异有统计学意义( $t=-12.30, P<0.05$ );TGP 组治疗前后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率为(6.15 $\pm$ 1.45)%、(11.49 $\pm$ 1.14)% ,二者差异也有统计学意义( $t=-16.68, P<0.05$ );常规组与 TGP 组治疗后 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率比较,差异有统计学意义( $t=-6.46, P<0.05$ ),见图 2。



\*:  $t=-6.46, P<0.05$ ,与 TGP 组治疗后比较。

图 2 外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达水平比较

## 3 讨论

SLE 作为一个重要的系统性自身免疫疾病,主要表现为自身反应性 T 细胞和 B 细胞的活化,以及致病性自身抗体的产生。大量研究显示,自身免疫性疾病的易感和诱发与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的数量降低或功能减退存在着重要相关性<sup>[12-13]</sup>。其中也包括 SLE 的具体发生原因。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 在机体免疫体系中所发挥的作用主要体现在自身免疫耐受,同时对外来抗原保持一定的应答活性<sup>[14]</sup>。其功能主要为:通过释放抑制性细胞因子,抑制 T 细胞对自身抗原的免疫应答,进而抑制其细胞的活化对自身组织的损害。除了对效应 T 细胞的影响外,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞还可抑制炎症细胞及其产生的相关炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-6)和调节因子(IL-10)以减轻机体组织损伤<sup>[13]</sup>。这一过程对维持内环境稳态具有重要意义,主要体现在预防自身免疫性疾病的发生及诱导移植耐受等<sup>[15-17]</sup>。

本研究中,对各 60 例活动期 SLE 患者及健康人抽取外周血,测定 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞比率水平,结果显示活动期 SLE 患者外周血中 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达率明显低于健康人。

通过对治疗后稳定的 SLE 患者进行检查发现,外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞的表达率升高但仍低于健康对照组。结论进一步证实 SLE 患者的发病过程与 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞水平之间存在的相关性<sup>[10-11,18]</sup>。即 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞水平的下降会导致 T、B 淋巴细胞激活,产生多种自身抗体,最终造成多器官损伤<sup>[19]</sup>。

临床上对 SLE 的治疗,常规以糖皮质激素和环磷酰胺为主。在改善患者病情的同时伴随着一定的药物不良反应的发生,如糖皮质激素长期、大量使用易引起感染、消化道溃疡、骨坏死等严重并发症;此外,环磷酰胺长期使用,则会引起肝毒性等不良反应<sup>[20]</sup>。因此,在保证 SLE 患者药物治疗有效性的同时如何最大程度地降低不良反应是临床医师所面临的重要问题。针对这一问题,国内部分学者通过使用 TGP 进行联合辅助治疗,临床发现激素及免疫抑制剂的使用剂量降低且不良反应得到改善<sup>[21-22]</sup>。

本试验在常规用药治疗的基础上结合使用 TGP 进行辅助治疗,比较常规组与 TGP 组间的 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞水平。结果发现,TGP 辅助治疗 60 d 后,其 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞数量较治疗前显著上升,并且要高于常规组水平。这一变化趋势同疾病的具体临床表现变化一致。表明 TGP 对 SLE 的治疗作用机制之一是上调 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞数量,从而抑制各种免疫反应。但其具体机制尚不甚清楚,有待进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Van Amelsfort JM, Jacobs KM, Bijlsma JW, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid[J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(9):2775-2785.

[2] Lindley S, Dayan CM, Bishop A, et al. Defective suppressor function in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells from patients with type I diabetes[J]. *Diabetes*, 2005, 54(1):92-99.

[3] Murphy TJ, Choileain NN, Zang Y, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells control innate immune reactivity after injury[J]. *J Immunol*, 2005, 174(5):2957-2963.

[4] 祝玉慧,魏春华. 白芍总苷联合小剂量激素治疗系统性红斑狼疮 35 例临床观察[J]. *山东医药*, 2009, 49(5):100-101.

[5] 帅宗文,徐建华,刘爽,等. 白芍总苷辅助治疗系统性红斑狼疮的临床观察[J]. *中国中西医结合杂志*, 2003, 23(3):164-167.

[6] 万琦兵,杨惠琴. 白芍总苷联合甲强龙片治疗系统性红斑狼疮肝损害 62 例[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2009, 19(3):181-182.

[7] 张洪峰,肖卫国,侯平. 白芍总苷治疗系统性红斑狼疮的临床研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2011, 31(4):476-479.

[8] 李志军,刘雁,陈琳洁,等. 白芍总苷治疗系统性红斑狼疮合并白细胞减少症患者 33 例[J]. *临床药学*, 2004, 13(4):67-68.

[9] 刘云,刘向东. 来氟米特联合白芍总苷治疗系统性红斑狼疮 28 例[J]. *新乡医学院学报*, 2007, 24(3):295-297.

[10] 孙乐栋,孙竞,曾抗,等. 自体外周血纯化 CD34<sup>+</sup>T 细胞移植对系统性红斑狼疮患者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞表达的影响[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2008, 29(3):301-304.

[11] 孙乐栋,曾抗,刁友涛,等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 细胞在系统性红斑狼疮患者外周血的表达研究[J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10(9):573-575.

[12] 李霞,栗占国. CD4<sup>+</sup>调节性 T 细胞及其在自身免疫病中的意义[J]. *中华风湿病学杂志*, 2004(8):499-501.

[13] 胡朝军,李永哲,刘定华等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞与系统性红斑狼疮病情活动性关系的研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2007, 5(5):78-82.

[14] 主鸿鹄,陈复兴,徐开林,等. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞:一类新被认识的免疫调节细胞[J]. *国外医学免疫学分册*, 2004(27):87-90.

[15] Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, et al. Ex vivo isolation and characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T cells with regulatory properties from human blood[J]. *Exp Med*, 2001, 193(11):1303-1310.

[16] 侯芸. 调节性 T 细胞、TGF- $\beta$  与系统性红斑狼疮[J]. *中国中西医结合皮肤性病学杂志*, 2005(4):127-130.

[17] 奚桂林. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性 T 细胞研究进展[J]. *国外医学免疫学分册*, 2004, 27:141-145.

[18] Crispin JG, Martinez A, Aicocer, Vareia J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *J Autoimmune*, 2003, 21(3):273-276.

[19] 陈静. 白芍总苷对系统性红斑狼疮治疗作用及不良反应[J]. *中国医疗前沿*, 2013, 8(6):28.

[20] 金兰,赵钟祥,曾庆忠. 赤芍化学成分和药理作用的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(9):965.

[21] 马丽,李作孝. 白芍总苷的免疫调节功能及其临床应用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 17:252-254.

[22] 钟益萍,米向斌,张苑,等. 白芍总苷辅助治疗系统性红斑狼疮的 Meta 分析[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2013, 7(22):10186-10191.

(收稿日期:2014-07-13 修回日期:2014-09-02)

## 2014 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-63604477。

来稿须将审稿费 50 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!